

**MANIFESTACIONES SEMIOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE
Salvia officinalis (Lamiaceae) FRENTE A *Stegomyia aegypti*
(Reinert *et al.*, 2009) (DIPTERA: CULICIDAE).**

RUTH MARIELA CASTILLO MORALES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTADER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2015**

**MANIFESTACIONES SEMIOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE
Salvia officinalis (Lamiaceae) FRENTE A *Stegomyia aegypti*
(Reinert *et al.*, 2009) (DIPTERA: CULICIDAE).**

RUTH MARIELA CASTILLO MORALES

Trabajo de grado para optar al título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

JONNY EDWARD DUQUE LUNA, Ph.D.en Entomología

Codirectora

STELIA CAROLINA MÉNDEZ SANCHEZ, Ph.D.en Ciencias Bioquímicas

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTADER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2015**

*A Diego, quien sin importar la distancia,
me apoyó desde el comienzo de esta aventura
que ahora vivimos juntos.....*

*A mi madre, por su apoyo
Incondicional y constante.*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Jonny E. Duque, pues sin conocerme creyó en mí desde el comienzo y me brindó la oportunidad de ser una integrante del CINTROP. Por su apoyo, paciencia, colaboración y orientación a lo largo de mi proceso de formación, no solo como estudiante de maestría, sino como ser humano.

A mi Codirectora, la Dra. Stelia Carolina Sánchez, por su apoyo, confianza, guía y orientación. Por permitirme trabajar en su laboratorio, aprender y ser parte activa del mismo.

A los dos, Profe Jonny y Profe Carolina, por ser para mí no solo un ejemplo a seguir como profesionales, sino como seres humanos. Por confiar en mis capacidades, apoyarme, cuidarme, guiarme y abrir las puertas de su casa.

A COLCIENCIAS, por permitir el desarrollo de este proyecto mediante su financiación a través del Centro de Investigación de Excelencia (CENIVAM).

Al Centro Nacional de Investigaciones para la Agro industrialización de Especies Vegetales Aromáticas (CENIVAM) por suministrar el aceite esencial y la caracterización del mismo.

A todos los integrantes del CINTROP, a Gustavo, Juliana, Natalia y Mayra por su apoyo en diferentes etapas del proceso, especialmente por su amistad sincera; a Aurora, Sharon y Andrés por su colaboración en la ejecución de las pruebas. A todos los estudiantes de Diseño Industrial e Ingeniería Química quienes de una u otra forma brindaron su apoyo en el cuidado de las colonias.

A los compañeros del Laboratorio 402, Yenny, Luis Carlos, Jennifer, Linda, Diana, por su compañía y colaboración.

A Inés del Laboratorio 403, por su paciencia y apoyo en el préstamo de equipos. A los integrantes de los laboratorios del CINBIN, Química Orgánica y Virología por su paciencia y colaboración en el préstamo de equipos.

A los integrantes del Laboratorio de Entomología Médica y Veterinaria de la Universidad Federal do Paraná, en cabeza del Dr. Mario A. Silva, por permitirme conocerlos y realizar mi pasantía.

A mi familia, mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en todo momento, por siempre brindar palabras de aliento y preocuparse por mí.

A Diego por su amor, paciencia, apoyo y comprensión a lo largo de este proceso.

A la familia Gómez-Díaz por su compañía, apoyo y buenos deseos.

A mis amigos, que desde la distancia me apoyaron y me alentaron para seguir en este proceso formativo.

A Doña Nelly y Diana, quienes me brindaron su sincera amistad y me trataron como a un miembro más de su familia.

CONTENIDO

| | Pág |
|---|-----|
| INTRODUCCIÓN | 21 |
| 1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 23 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 26 |
| 3. PREGUNTA DE INVESTIGACION | 28 |
| 4. MARCO TEÓRICO Y/O ESTADO DEL ARTE | 29 |
| 4.1. DENGUE EN COLOMBIA | 29 |
| 4.2. LA FIEBRE CHIKUNGUNYA EN COLOMBIA | 30 |
| 4.3. <i>Stegomyia aegypti</i> | 31 |
| 4.4. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS | 32 |
| 4.5. BIOPROSPECCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES | 34 |
| 4.6. SALVIA | 36 |
| 4.6.1. Propiedades biológicas de <i>S. officinalis</i> | 39 |
| 5. OBJETIVOS | 42 |
| 6. MATERIALES Y METODOS | 43 |
| 6.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL | 43 |
| 6.2. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> | 44 |
| 6.3. MATERIAL BIOLÓGICO | 44 |
| 6.4. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD | 46 |
| 6.4.1. <i>Aactividad ovicida</i> | 46 |
| 6.4.2. <i>Actividad larvicida</i> | 47 |
| 6.4.3. <i>Actividad pupicida</i> | 48 |
| 6.4.4. <i>Actividad adulticida</i> | 48 |
| 6.4.5. <i>Actividad repelencia a la picada de los mosquitos</i> | 50 |
| 6.4.6. <i>Actividad deterrente</i> | 51 |
| 6.5. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN | 51 |
| 6.5.1. <i>Determinación de la presencia/ausencia de degradación de ADN total de Stegomyia aegypti</i> | 51 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.5.2. | <i>Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa</i> | 53 |
| 6.5.3. | <i>Ensayo de evaluación del mecanismo de acción mitocondrial</i> | 55 |
| 6.6. | Análisis estadístico | 59 |
| 7. | RESULTADOS | 60 |
| 7.1. | COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE Y ANALISIS <i>in silico</i> | 60 |
| 7.2. | ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD | 61 |
| 7.2.1. | Bioensayos actividad ovicida | 61 |
| 7.2.2. | Actividad larvicida | 72 |
| 7.2.3. | Actividad pupicida | 73 |
| 7.2.4. | Actividad adulticida | 74 |
| 7.2.5. | Actividad repelencia a la picada de los mosquitos | 74 |
| 7.2.6. | Actividad deterrente | 75 |
| 7.3. | DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN | 76 |
| 7.3.1. | <i>Determinación de la presencia/ausencia de degradación de ADN total de Stegomyia aegypti</i> | 76 |
| 7.3.2. | <i>Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa</i> | 79 |
| 7.3.3. | <i>Ensayo de evaluación del mecanismo de acción mitocondrial</i> | 79 |
| 8. | DISCUSIÓN | 85 |
| 8.1. | COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL | 85 |
| 8.1.1. | Cribado virtual | 87 |
| 8.2. | ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD | 88 |
| 8.2.1. | Bioensayos actividad ovicida | 88 |
| 8.2.2. | Actividad larvicida | 90 |
| 8.2.3. | Actividad pupicida | 92 |
| 8.2.4. | Actividad adulticida | 93 |
| 8.2.5. | Actividad de repelencia a la picada de los mosquitos | 94 |
| 8.2.6. | Actividad deterrente | 96 |
| 8.3. | DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN | 97 |
| 8.3.1. | <i>Presencia/ausencia de degradación de ADN total de S. aegypti</i> | 97 |
| 8.3.2. | <i>Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa</i> | 98 |
| 8.3.3. | <i>Mecanismo de acción mitocondrial</i> | 100 |

| | |
|---------------------|-----|
| 9. CONCLUSIONES | 103 |
| 10. RECOMENDACIONES | 105 |
| BIBLIOGRAFIA CITADA | 106 |
| ANEXOS | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Componentes químicos de <i>S. officinalis</i> . Tomado de Hernández <i>et al.</i> (2013). | 38 |
| Figura 2. Componentes químicos del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> . Tomado de Hernández <i>et al.</i> (2013). | 38 |
| Figura 3. Método de extracción hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), empleado por el CENIVAM para la obtención del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> (Tomado de Stefanidis <i>et al.</i> , 2014). | 44 |
| Figura 4. a. Colonia Rockefeller de <i>S. aegypti</i> , mantenida en condiciones de cría en la Sede UIS Guatiguará. b. Rata albina (<i>Rattus norvegicus</i>) de raza Winstar empleada para alimentar la colonia (Fotos: Autor). | 45 |
| Figura 5. Dispositivo de acrílico modificado por CINTROP (2013) para la evaluación de la actividad de repelencia a la picada de mosquitos (Foto: Autor). | 49 |
| Figura 6. Diseño experimental de la determinación de presencia/ausencia de degradación de ADN total de larvas de <i>S. aegypti</i> . A. Extracción de ADN de larvas tratadas con el AE; B. Extracción de ADN de larvas sin tratamiento previo con el AE; C. ADN purificado y tratado directamente con el AE. | 53 |
| Figura 7. Esquema de la reacción del método de Ellman para la cuantificación de acetilcolinesterasa (Ellman <i>et al.</i> , 1961). | 54 |
| Figura 8. Porcentaje de eclosión de huevos de 0-12 horas y de 0-72 horas, obtenidos en diferentes concentraciones del AE de <i>Salvia officinalis</i> (1, 5, 37 y 50 mg.L ⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,086; huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,337. | 62 |

Figura 9. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de 0-12 horas y de 0-72 horas (\pm DS), obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,27; huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,269.

63

Figura 10. Porcentaje de huevos 0-12 horas con malformaciones en el embrión, obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,0742. R=0,66.

64

Figura 11. Tipos de malformaciones observadas en el embrión en huevos de 0-12 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1 mg.L⁻¹: embriones mal formados, la capsulas cefálicas indistinguibles; 5 mg.L⁻¹: malformaciones en cabeza, segmentos del abdomen con malformaciones; 37 mg.L⁻¹: cabezas malformadas y fusionadas con el tórax; 50 mg.L⁻¹: corion débil, los embriones no son claramente distinguibles. Huevos sin embrión distinguible, no viables para pasar a fase larval.

65

Figura 12. Porcentaje de huevos 0-72 horas con malformaciones en el embrión, obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,3667. R=0,265.

66

Figura 13. Tipos de malformaciones observadas en el embrión en huevos de 0-72 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1mg.L⁻¹: malformaciones en cabeza, aumento anormal del tamaño del huevo, tórax y abdomen con malformaciones; 5mg.L⁻¹: malformaciones en cabeza, o capsula cefálica no distinguible, tórax de tamaño pequeño; 37 mg.L⁻¹: embriones con tórax escasamente distinguible, cabeza de gran tamaño y segmentos abdominales con malformaciones; 50 mg.L⁻¹: secciones del embrión indistinguibles, malformaciones en cabeza y en

segmentos abdominales. 67

Figura 14. Porcentaje de huevos con eclosión anormal obtenidos de 0-12 horas y 0-72 horas, en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). * Diferencias estadísticas significativas con relación al control en huevos 0-12 horas (Kruskal-Wallis test: p =0,030). No se encontraron diferencias estadísticas significativas para huevos 0-72 horas (Kruskal-Wallis test: p =0,6517). 68

Figura 15. Huevos con eclosión anormal observados en el tratamiento 0-12 horas y obtenidos de la prueba de ovoposición con el AE de *Salvia officinalis*. a. Eclosión normal (Control). b. Emergencia anormal de una larva L1, la cual murió después de unas horas. c. Eclosión anormal, el corion se encuentra totalmente abierto. 69

Figura 16. Huevos con eclosión anormal observados en el tratamiento 0-72 horas, y obtenidos de la prueba de ovoposición con el AE de *Salvia officinalis*. a. Eclosión normal (Control). b. Emergencia anormal del embrión, por un costado del huevo. c. Eclosión anormal, el corion se encuentra totalmente abierto. 69

Figura 17. Porcentaje de larvas anormales observadas de huevos 0-12 horas y huevos 0-72 horas obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,1710; huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,3492. 70

Figura 18. Tipos de malformaciones larvarias observadas en huevos de 0-12 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1 mg.L⁻¹: cabeza más grande que el tórax, movimientos lentos; 5 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica (Imagen izquierda), anormalidades en las branquias anales (Imagen derecha); 37 mg.L⁻¹: tórax más estrecho de lo normal, comportamiento lento frente a estímulos externos; 50 mg.L⁻¹: cabeza pegada al tórax (inferior derecha) en comparación con una

larva normal (Superior izquierda). 71

Figura 19. Tipos de malformaciones larvarias observadas en huevos de 0-72 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica; 5 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica; 37 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica, tórax y abdomen más cortos y pequeños de lo normal; 50 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica, anomalías en el tracto digestivo, abdomen con malformaciones. 71

Figura 20. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Larvas sometidas a concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀ del aceite esencial de *Salvia officinalis*, por 24 hrs. Control (-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Campotepcina a 4 µM. CPT 24 hrs: ADN de larvas previamente tratadas; CPT Homo: El CPT adicionado en el homogenato de larvas previo a la extracción de ADN; CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN. 77

Figura 21. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Acción del aceite esencial de *Salvia officinalis* adicionado durante la homogenización de las larvas (L3-L4) a concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀. Control (-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Campotepcina a 4 µM. CPT Homo: El CPT adicionado en el homogenato de larvas previo a la extracción de ADN; CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN. 78

Figura 22. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Acción del aceite esencial de *Salvia officinalis* adicionado directamente en el ADN antes de ser sembrado en el pozo, a concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀. Control(-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Campotepcina a 4 µM. CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN. 78

Figura 23. Porcentajes de inhibición de la enzima acetil-tiocolina con el aceite

esencial de *Salvia officinalis*. Control positivo con Propoxur IC50=0,015. Análisis de Correlación R= 0,94. 79

Figura 24. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (Estado 3) con glutamato y succinato. Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar. ADP a 0,6mM; glutamato a 5mM; succinato a 3mM; fosfato inorgánico a 1,6mM; mitocondria a 1mg.mL. 81

Figura 25. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (Estado 4) con glutamato y succinato (3mM). Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar. ADP a 0,6mM; glutamato a 5mM; succinato a 3mM; fosfato inorgánico a 1,6mM; mitocondria a 1mg/mL. 81

Figura 26. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR) con glutamato y succinato. Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar. ADP a 0,6mM; glutamato a 5mM; succinato a 3mM; fosfato inorgánico a 1,6mM; mitocondria a 1mg/mL. 82

Figura 27. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial: NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, NADH reductasa, NADH oxidasa y succinato oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas con respecto al control succinato deshidrogenasa $p=0,012$; succinato oxidasa $p=0,03$. 84

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Caracterización química del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> (Salvia). | 60 |
| Tabla 2. Cribado virtual de los componentes mayoritarios del AE de <i>S. officinalis</i> . Parámetros de Lipinski, CLogP: solubilidad en lípidos; solubilidad en agua; peso molecular; TPSA: Área de superficie polar topológica. Perfiles para riesgo mutagénico: (1) Mutagénico; (2) Tumorigénico; (3) Irritante; (4) Teratogénico. | 61 |
| Tabla 3. Actividad larvicida del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> . 24 horas: Kruskal-Wallis test: H (5, N= 18) F = 8,072327 p =0,1523; 48 horas Kruskal-Wallis test: H (5, N= 18) F =7,970630 p =0,1579. | 72 |
| Tabla 4. Concentraciones letales 50 y 90 de actividad larvicida del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> . | 73 |
| Tabla 5. Actividad pupicida del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> . 24 horas: Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) F=7,533333 p =0,0567. *Diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas (Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) F=8,569604 p =0,0356) | 73 |
| Tabla 6. Actividad adulticida del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> . Letras iguales indican diferencias estadísticas significativas con respecto al control. a. 60 minutos p=0,022; b. 120 minutos p=0,028; c. 24 horas p=0,0084. | 74 |
| Tabla 7. Actividad repelente del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> evaluado de 0 a 2 minutos y de 0 a 15 minutos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control. | 75 |
| Tabla 8. Actividad de inhibición de la ovoposición de del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> . OAI: Índice de actividad de la ovoposición, IE: Efecto de inhibición. *Significativamente diferente del control (p=0,015). | 76 |

ANEXOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Anexo A. Consideraciones éticas | 128 |
| Anexo B. Metodología de extracción de ADN de <i>Aedes aegypti</i> . (Kit de extracción UltraClean® Tissue & Cells) | 137 |
| Anexo C. Consentimiento Informado. | 139 |
| Anexo D. Divulgación de los resultados | 142 |

RESUMEN

MANIFESTACIONES SEMIOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE *Salvia officinalis* (Lamiaceae) FRENTE A *Stegomyia aegypti* (Reinert *et al.*, 2009) (DIPTERA: CULICIDAE).

Autor: CASTILLO MORALES, Ruth M.*

Palabras clave: Bioactividad, aceite esencial, acción mitocondrial, inhibición acetilcolinesterasa.

Se evaluó la bioactividad del aceite esencial (AE) de *Salvia officinalis* y su mecanismo de acción frente al mosquito vector del dengue, *Stegomyia aegypti*. La actividad ovicida, larvicida, pupicida, adulticida, de repelencia a la picada y acción deterrente de ovoposición fue evaluada con una colonia de *S. aegypti* cepa Rockefeller. Se usaron concentraciones exploratorias (CE) y concentraciones múltiples, registrando porcentajes de mortalidad a las 24 y 48 horas. La presencia de degradación de ADN total fue determinada mediante electroforesis y para la evaluación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa fue empleado el método de Ellman. El mecanismo de acción mitocondrial se evaluó mediante la cuantificación del Control respiratorio y actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. *S. officinalis* mostró actividad ovicida, malformaciones en el embrión y alteración de larvas eclosionadas a todas las concentraciones evaluadas. El mayor porcentaje de actividad larvicida fue observado a las 24 horas a 63 y 76 mg.L⁻¹ (26,7±13,4 y 36,7±18,6%). Para pupas la mayor mortalidad se registró a 310 y 390 mg.L⁻¹ a 48 horas (88,89±1,53 y 100±0%). En adultos el mayor porcentaje de mortalidad fue a 300 mg.L⁻¹ con 57,5±0%, el porcentaje de repelencia fue de 48±3.6% a 1000 mg.L⁻¹. La actividad de inhibición de la ovipostura a 200 mg.L⁻¹ fue 97±4,81%, con un índice de actividad de oviposición (IAO): -0,94. El AE mostró inhibición de la enzima AChE y evidenció degradación de ADN total cuando se adicionó en el homogenato de larvas, indicando un posible daño en otros componentes celulares relacionados con la integridad del ADN. Las pruebas mitocondriales indicaron inhibición en el Complejo II de la cadena transportadora de electrones, alterando la producción de ATP. *S. officinalis* puede ser utilizado como alternativa en el control de mosquitos, al presentar efectos en todos los estadios de desarrollo y un mecanismo de acción múltiple.

*Facultad de Medicina. Escuela de ciencias básicas. Director: Jonny E. Duque Luna.

ABSTRACT

SEMIOCHEMICAL MANIFESTATIONS AND MECHANISM OF ACTION OF *Salvia officinalis* ON *Stegomyia aegypti* (Reinert *et al.*, 2009) (DIPTERA: CULICIDAE)

Authors: CASTILLO MORALES, Ruth M.*

Key words: Bioactivity, essential oil, mitochondrial action, acetylcholinesterase inhibition.

We evaluated the bioactivity of essential oil from *Salvia officinalis* and its mechanism of action on dengue mosquito vector, *Stegomyia aegypti*. The ovicidal, larvicidal, pupicidal, adulticidal, repellency activity against mosquito bites and oviposition deterrent activities were evaluated with a Rockefeller colony of *S. aegypti*. Insecticidal activity was assessed at exploratory concentrations (EC) and multiple concentrations, mortality recording at 24 h and the other at 48 h. The degradation of DNA was determinate with electrophoresis and enzymatic tests of enzyme acetylcholinesterase *in vitro* were performed the Ellma's bioassay. The mechanism of mitochondrial action was evaluated with respiratory control and enzymatic activity of mitochondrial respiratory chain. *S. officinalis* showed ovicidal activity with embryo malformations and alteration in hatched larvae. The strongest larvicidal activity was at 24 hours with 63 and 76 mg.L⁻¹ (26,7±13,4 y 36,7±18,6%). For pupae the highest mortality was recorded at 310 and 390 mg.L⁻¹ to 48 hours (88, 89±1,53 and 100±0%). In adults the highest mortality percent was shown at 300 mg.L⁻¹ with 57.5±0%. The repellent activity was 53.85±1% at 1000 mg.L⁻¹. The deterrent activity of oviposition at 200 mg.L⁻¹ was 97±4.81%, with oviposition activity indices (OAI) of -0.94. The EO showed enzyme acetylcholinesterase inhibition and DNA degradation when it added in the larvae homogenate, indicating a possible involvement of other cellular components associated with DNA integrity. The mitochondrial bioassays showed inhibition in the complex II of respiratory chain, altering ATP production. *S. officinalis* has a potential use in mosquito control for introducing effects in all stages of development and multiple *target* of action.

*School of Medicine, Department of Basic Sciences. Director: Jonny E. Duque Luna.

INTRODUCCION

La familia Culicidae incluye aproximadamente 3500 especies de mosquitos, de las cuales un alto porcentaje son de importancia en salud pública debido a que tienen hábitos antropofílicos y se alimentan de sangre (Reinert *et al.*, 2009; Abou, 2014). Varias de estas especies son vectores de agentes causantes de enfermedades como malaria, dengue, fiebre chikungunya, filariasis, encefalitis y otras enfermedades virales. Se estima que las enfermedades transmitidas por mosquitos causan cada año más de un millón de muertes alrededor del mundo (Phukerd *et al.*, 2013).

Stegomyia aegypti (= *Aedes aegypti*) (Reinert *et al.*, 2009) es el vector más importante del virus del dengue y de la fiebre chikungunya en áreas urbanas y periurbanas en zonas tropicales y subtropicales. Aunque generalmente la especie no se encuentra por encima de los 1000 msnm, en Colombia se ha reportado a 2200 msnm (Rodríguez & De la Hoz, 2005) influyendo notablemente en la incidencia del dengue, y más recientemente, del virus chikungunya, de manera que gran parte de la población se encuentra en riesgo de desarrollar cualquiera de estas dos patologías (Singh *et al.*, 2012; Soonwera & Phasomkusolsil, 2014).

Ante la ausencia de una vacuna disponible para dengue y fiebre chikungunya, las medidas de control de estas patologías consisten en el uso de insecticidas químicos dirigidos a las poblaciones del vector (Escobar *et al.*, 1999; Rodríguez, 2002). Sin embargo, dentro de los inconvenientes del uso indiscriminado de estas sustancias químicas se encuentran el efecto perjudicial en el ambiente, en organismos no diana y generación de mecanismos de resistencia a las moléculas empleadas (Freitas *et al.*, 2010; Elumalai *et al.*, 2012; Maheswaran & Ignacimuthu, 2012).

Los problemas vectoriales han llevado a desarrollar nuevas estrategias de control del mosquito que sean ambientalmente seguras, biodegradables y específicas (Maheswaran & Ignacimuthu, 2012). De esta manera, los productos de origen vegetal, como aceites

esenciales y extractos vegetales se presentan como una alternativa para reducir el uso de insecticidas tradicionales para el control de *S. aegypti*.

Los aceites esenciales (AE) son subproductos del metabolismo secundario de las plantas, constituidos por sustancias que no están involucradas en mecanismos primordiales como la generación de tejidos, producción de energía y síntesis de biomoléculas (proteínas, lípidos, azúcares, etc.). Sin embargo, lo complementan con funciones específicas, al servir de defensa química contra la acción de diversos factores externos como la presencia de patógenos, insectos e incluso cambios bruscos en el medio circundante (Koul *et al.*, 2008; Avalos & Pérez, 2009; García & Pérez, 2009; Leyva *et al.*, 2012a; Ringuelet & Viña, 2013). Los componentes del metabolismo secundario ofrecen alternativas para el control de vectores a diferentes niveles de sus ciclos de vida con acción de tipo ovicida, larvicida, adulticida, repelente, atrayente y deterrente (Maheswaran & Ignacimuthu, 2012).

Por ello, el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) viene desarrollando la evaluación *screening* de 170 aceites esenciales y extractos en *Stegomyia aegypti*, entre los que sobresale la acción biocida de *Salvia officinalis* (Lamiaceae). Sin embargo, aun cuando la mayoría de los estudios publicados se enfocan en evaluar el efecto biocida de los aceites esenciales, es escaso el conocimiento de su mecanismo de acción. En ese sentido, el presente trabajo busca dilucidar la forma como actúa el aceite esencial de *S. officinalis* en *S. aegypti*, partiendo desde la experimentación del efecto del AE en todas las fases de desarrollo del mosquito, actividad ovicida, larvicida, pupicida, adulticida, de repelencia a la picada y actividad deterrente.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es la enfermedad viral sistémica aguda que causa mayor morbilidad, mortalidad y afectación económica a nivel mundial (WHO, 2013). El principal vector de esta enfermedad en el continente americano es el mosquito *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) que está adaptado a áreas urbanas y peri-urbanas (Simmons *et al.*, 2012). Se estima que cada año ocurren 50 millones de infecciones distribuidas en aproximadamente 100 países ubicados en áreas tropicales y subtropicales. El agente etiológico del dengue es un virus del género *Flavivirus* (Flaviviridae) con cuatro serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) (Simmons *et al.*, 2012).

La fiebre chikungunya es causada por un alfavirus (virus chikungunya) y también es transmitida por los mismos vectores del dengue (OPS/CDC, 2011; Lo Presti *et al.*, 2014). Desde el año 2004, esta enfermedad ha expandido su distribución geográfica, haciendo su introducción en las Américas en diciembre de 2013. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), entre esa fecha y el 2015 se han registrado 90.481 casos sospechosos y 577 casos confirmados en Colombia, con una tasa de incidencia de 188.4 casos por cada 100.000 habitantes. En general, se destaca por ser de curso benigno, con 1% de letalidad en personas mayores y menores de cinco años. Sin embargo un 72-97% de los infectados desarrollan síntomas, con un cuadro clínico altamente invalidante (Lo Presti *et al.*, 2014).

Los actuales esfuerzos para frenar la transmisión del dengue y de la fiebre chikungunya se centran en el control del vector mediante la combinación de insecticidas químicos y estrategias con enfoque de concientización cultural, donde se eliminan los contenedores de cría (Escobar *et al.*, 1999; Rodríguez, 2002). Los insecticidas autorizados por el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Protección Social para el control del vector son organofosforados (malatión y temefos), piretroides (lambdacialotrina, deltametrina y ciflutrina) y reguladores de crecimiento (Pyriproxyfen, Fenoxicarb) (Ministerio De Protección Social *et al.*, 2011). Para el control de estados juveniles se emplean reguladores de crecimiento como el temefos, y para adultos

son utilizados piretroides (Santacoloma *et al.*, 2010; Cadavid *et al.*, 2011; Ocampo *et al.*, 2011; Santacoloma *et al.*, 2012). Sin embargo, las estrategias químicas no han logrado detener el incremento de casos para las dos enfermedades, ni la dispersión de los vectores a nuevas áreas. No obstante, si ha generado de manera indirecta la selección de poblaciones resistentes del vector a las moléculas empleadas para su control y contaminación del medio ambiente (Santacoloma *et al.*, 2010; Leyva *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2013).

Los productos de origen vegetal, como aceites esenciales y extractos vegetales que presentan algún tipo de bioactividad comprobada juegan un papel importante en el control de la transmisión de las enfermedades transmitidas por vectores (Rojas *et al.*, 2010). En la actualidad se presentan como la alternativa para el reemplazo de los insecticidas tradicionales usados en los programas de control de vectores debido a que contienen una amplia gama de compuestos activos biológicos y propiedades toxicológicas que actúan como insecticidas de contacto, repelentes y anti-alimentarios; además de ser biodegradables (Zoubiri & Baaliouamer, 2011).

Los aceites esenciales son una compleja mezcla de compuestos químicos producidos por las plantas de manera natural, los cuales en su mayoría son útiles como mecanismo de defensa y comunicación química (Koul *et al.*, 2008; Leyva *et al.*, 2012a). Se han realizado diferentes estudios describiendo la riqueza de los componentes mayoritarios de estos aceites esenciales y su actividad sobre diferentes fases de desarrollo en mosquitos de importancia médica (Mathivanan *et al.*, 2010; Ponnusamy *et al.*, 2010; Aciole *et al.*, 2011; Baldeón, 2011; Govindarajan y Sivakumar, 2011; Elango *et al.*, 2012; El-Gendy y Shaalan, 2012; Leyva *et al.*, 2012a; Gokulakrishnan *et al.*, 2013; Suman *et al.*, 2013). Sin embargo, en relación a la bioactividad sobre *S. aegypti*, la mayoría de reportes se enfocan en evaluar el efecto larvicida, pupicida y repelente, pero es poco lo que se conoce sobre el mecanismo de acción (Ramírez *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2010; Yañez *et al.*, 2010; Leyva *et al.*, 2012b; De la Rosa *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que la búsqueda de nuevas alternativas de control de vectores en productos de origen vegetal, no solo debe ser segura para el ambiente, sino para otro tipo de organismos, se detecta la necesidad de profundizar más en la bioactividad y mecanismo de acción de los AEs en *S. aegypti*

mediante el efecto ovicida, larvicida, pupicida, adulticida, repelente, atrayente y deterrente del aceite esencial de *S.officinalis* en *S. aegypti*. Además, se dilucida el mecanismo de acción del aceite en potenciales sitios de acción o *target* del mosquito como el ADN, la enzima acetilcolinesterasa y la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

2. JUSTIFICACION

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más común a nivel mundial, con un aumento creciente de casos en las regiones tropicales, especialmente en el continente americano (Licastro *et al.*, 2010). En Colombia, la incidencia del dengue ha venido aumentando de manera constante en los últimos años, con una gran parte de la población en riesgo de desarrollar la enfermedad (Rey & Rodríguez, 2005).

Aun cuando la fiebre chikungunya es una enfermedad históricamente cíclica con periodos inter-epidémicos que oscilan entre 3 y 4 años (Lo Presti *et al.*, 2014), desde el año 2004 ha expandido su distribución geográfica, provocando epidemias sostenidas, especialmente en Asia y África (CDC-OPS, 2011). La reciente reemergencia del virus ha causado un riesgo continuo de introducción y transmisión sostenida en áreas tropicales y subtropicales, donde *S. aegypti* se encuentra ampliamente distribuido. Según la OPS, desde su introducción en las Américas, el virus ha causado más de 44.000 casos en más de 20 países en el Caribe, América central y América del Sur, y se espera que tenga el mismo comportamiento epidemiológico que el dengue (CDC-OPS, 2011).

Ante la ausencia de una vacuna comercialmente disponible para las dos patologías, las medidas para el control de la enfermedad consisten en el uso regular de insecticidas químicos dirigidos a las poblaciones naturales del vector. Sin embargo, un inconveniente del uso indiscriminado de estas sustancias químicas es el efecto perjudicial en otros organismos y en el medio ambiente (Elumalai *et al.*, 2012). Adicionalmente, la presión por el uso de insecticidas convencionales, junto con la plasticidad genética de *S. aegypti*, ha contribuido con la selección de poblaciones resistentes a los insecticidas (Freitas *et al.*, 2010).

Diferentes investigaciones describen el uso de aceites esenciales como potencial reemplazo de los productos químicos debido a su volatilidad, baja persistencia en campo, alta efectividad de sus componentes frente a una amplia gama de insectos y efecto sinérgico de sus componentes (Koul *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010; Días & Coutinho,

2014). Por ello, en los últimos años el equipo de investigadores del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) han desarrollado estrategias en el control de insectos que van desde la evaluación de productos comerciales hasta la síntesis de nuevas moléculas con acción insecticida. Es así como se está desarrollando un macroproyecto financiado por Colciencias titulado “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad Colombiana + Estudio de manifestaciones semioquímicas de aceites esenciales y extractos SFE (Extracción con fluidos supercríticos) de plantas tropicales colombianas, frente a *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)”, en el cual se encuentra anclado el presente trabajo de investigación.

Como resultado preliminar de estas investigaciones, se encontró una importante actividad biocida del aceite esencial de la especie *Salvia officinalis* (Lamiaceae), al cual se le han atribuido diferentes propiedades farmacológicas en medicina tradicional (González, 2009; Porte *et al.*, 2013). En relación a su efecto sobre mosquitos de importancia médica, existen algunos reportes de este aceite sobre larvas y adultos *S. aegypti*, pero no se conoce su efecto sobre otras fases de desarrollo del mosquito, y se desconoce el mecanismo de acción de sus componentes, los cuales deben ser estudiados con el propósito de ser empleados a futuro para un control integrado del vector (Ali *et al.*, 2015). De esta manera, el presente trabajo constituye el primer estudio que evalúa la acción de un aceite esencial en todos los estados de desarrollo de *S. aegypti* y que pretende dilucidar su mecanismo de acción en el mosquito.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION

¿Cuál es la actividad biológica que presenta el aceite esencial de *S. officinalis* sobre *S. aegypti*?

¿Cuál o cuáles son los posibles mecanismos de acción del aceite esencial de *S. officinalis* que expliquen su acción biológica y que puedan ser empleados en el control de *S. aegypti*?

4. MARCO TEORICO Y/O ESTADO DEL ARTE

4.1. DENGUE EN COLOMBIA

El dengue es la arbovirosis humana que causa mayor morbilidad, mortalidad y afectación económica a nivel mundial (Rueda, 2008). Cerca de dos tercios de la población vive en áreas infestadas con vectores de dengue, principalmente *S. aegypti* (Rojas, 2011). En los últimos años ha tenido un incremento significativo debido a la poca eficacia de los programas de control del vector, al cambio climático y al aumento de la urbanización no planificada, incidiendo directamente en un aumento en el número de casos reportados anualmente (Bello *et al.*, 2011).

A mediados de los años cincuenta, el Dengue ya estaba presente en el país y 28% del territorio nacional se encontraba infestado por el vector (Costa Atlántica, Valles interandinos de los ríos Cauca y Magdalena, el Puerto de Buenaventura en la Costa del Pacífica y Cúcuta) (Romero, 2012). Desde su reemergencia en la década de los setenta, se ha observado un incremento en la expansión geográfica e intensificación de la transmisión del dengue en el país; llegando a ser considerado endémico para la enfermedad a finales de 1980, considerando que cerca del 80% del territorio nacional está infestado por el vector (Rojas, 2011).

Las condiciones adecuadas de temperatura, humedad relativa y pluviosidad, hacen que se presente una transmisión endémica urbana en 620 municipios de Colombia, en los cuales más de 24 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Maestre & Gómez, 2013). Durante el año 2010 se presentó la mayor epidemia en la historia de Colombia: 157.202 casos de dengue, 221 muertes confirmadas y una letalidad de 2,3% (Romero, 2012).

De acuerdo con el SIVIGILA, hasta la semana epidemiológica 42 de 2014 se reportaron 87.037 casos de dengue, de los cuales 84.837 (97,5 %) corresponden a dengue y 2.200 (2,5 %) a dengue grave. A la semana epidemiológica 1 de 2015 se notificaron 1.471 casos

totales de dengue, 1.464 (99,5%) de dengue y 7 (0,5%) de dengue grave. El 78% de los casos procedieron de 12 entidades territoriales: Tolima, Valle del Cauca, Huila, Antioquia, Cundinamarca, Santander, Meta, Norte de Santander, Cesar, Atlántico, Caldas y Casanare. Para dengue grave, los casos provienen de Cartagena, Vichada, Quindío, Córdoba, Huila y Cundinamarca.

4.2. LA FIEBRE CHIKUNGUNYA EN COLOMBIA

El virus del Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus perteneciente a la familia *Togaviridae* causante de la fiebre chikungunya, enfermedad febril asociada a artralgias severas y brotes cutáneos (Lo Presti *et al.*, 2014). El nombre “Chikungunya” deriva de una palabra en lenguaje Kimakonde que significa “Estar contorsionado” o “Caminar encorvado”, haciendo referencia a algunas de los pacientes afectados con artralgias (Morens & Fauci, 2014).

Se cree que el virus se originó en África, donde se mantuvo en un ciclo selvático, involucrando primates salvajes y mosquitos arbóreos (Weaver & Lecuit, 2015). La enfermedad se identificó por primera vez en 1952 en la frontera entre Tanzania y Mozambique, y en 1953 el virus fue aislado e identificado de una muestra de suero de un ser humano febril (Lo Presti *et al.*, 2014; Morens & Fauci, 2014). La fiebre chikungunya fue introducida en Asia en 1962, donde fue el virus fue transmitido de humano a humano por los vectores *S. aegypti* y *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) a través de un ciclo urbano de transmisión (Lo Presti *et al.*, 2014).

En octubre del 2013 un virus chikungunya del linaje asiático fue introducido en la isla San Martín (Puerto Rico), detectándose en diciembre por primera vez transmisión autóctona del virus chikungunya, y posteriormente en el Caribe, Centro América y en el norte de Sur América (Weaver & Lecuit, 2015). Desde entonces y dada la amplia presencia del principal mosquito competente para la transmisión, *S. aegypti*, el virus se ha extendido rápidamente por la Región del Caribe y América del Sur (Morens & Fauci, 2014). La Organización Mundial de la Salud ha reportado que durante el período comprendido entre 2013 y 2014 el número de casos autóctonos sospechosos asciende a 737.084 y el de

confirmados a 10.6372. Por otra parte, la Organización Panamericana de la Salud reportó más de 355.000 casos a mediados del 2014 entre sospechosos y confirmados, con una continua transmisión en más de 20 países del continente Americano (Morens & Fauci, 2014).

De acuerdo a Weaver & Lecuit (2015) la transmisión del virus chikungunya por parte de *A. albopictus* y el aumento en los brotes presentados, se deben a factores demográficos, un aumento en la dispersión del mosquito y la rápida tasa de mutaciones adaptativas en el chikungunya.

En Colombia, según datos del SIVIGILA, se han presentado 114.930 casos entre 2014-2015, con circulación viral en 30 entidades territoriales: Amazonas, Atlántico, Arauca, Antioquia, Barranquilla, Bolívar, Boyacá, Caldas, Caquetá, Cartagena, Casanare, Cauca, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, La Guajira, Huila, Magdalena, Meta, Putumayo, Nariño, Norte de Santander, Sucre, Santander, Santa Marta, Quindío, Risaralda, Tolima, San Andrés y Valle del Cauca.

4.3. *Stegomyia aegypti*

S. aegypti es una especie exótica originada probablemente en África (Rodríguez & De la Hoz, 2005). Fue introducida al continente americano por medio de buques en barriles de agua, durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas. En la actualidad se distribuye en las franjas tropical y subtropical de todo el mundo, y aunque generalmente no se lo encuentra por encima de los 1000 msnm, en Colombia se ha reportado a 2200 msnm y más (Rodríguez & De la Hoz, 2005). Al contrario de África, donde existen formas tanto selváticas como domésticas, en el Nuevo Mundo *S. aegypti* es una especie antropofílica, que busca sitios de cría en recipientes naturales o artificiales ubicados al interior de las viviendas o en sus cercanías, rara vez a más de 100 metros de distancia de las casas (Harrington *et al.*, 2005).

Según FUNASA (2001), Rosi *et al.* (2002), Foster & Walker (2002), el ciclo de vida de *Stegomyia aegypti* se resume de la siguiente manera: Los huevos alongados y fusiformes

de *S. aegypti* (de aproximadamente 1 milímetro de largo) se adhieren a la superficie interna de los recipientes. En condiciones de alta temperatura y humedad completan su desarrollo embrionario en 48 horas. Son capaces de resistir largos periodos de latencia, constituyendo uno de los mayores obstáculos en el control del vector, ya que pueden ser trasladados grandes distancias en recipientes que no contienen líquidos. Cuando las larvas eclosionan, pasan por cuatro instares fotofóbicos y la duración de su desarrollo depende de la temperatura, disponibilidad de alimento y densidad larvaria. En condiciones favorables, la pupación ocurre en un lapso de 5 días.

Las pupas no se alimentan, cuando están inactivas se mantienen flotando en la superficie del agua, facilitando la emergencia del imago. Este estado dura generalmente de dos a tres días. Luego de emerger, el mosquito procura posarse sobre las paredes del recipiente, permaneciendo así durante varias horas, lo que permite el endurecimiento del exoesqueleto. El adulto de *S. aegypti* se caracteriza por presentar un diseño de escamas en forma de lira en el mesonoto (tórax), dos puntos blancos de escamas blanco-plateadas en el clípeo y escamas claras en los tarsos y palpos. Pasados uno o dos días después de su emergencia, los mosquitos se aparean, y luego de un periodo de reposo, las hembras buscan proveerse de sangre con el fin de iniciar su fase vitelogénica. La hembra grávida es atraída hacia sitios sombríos u oscuros de paredes ásperas en las cuales pueda depositar sus huevos, prefiriendo el agua limpia y clara para distribuir cada lote de huevos entre recipientes distintos.

4.4. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS

Debido a que las plantas son organismos sésiles, responden de diferentes maneras a los peligros de su entorno mediante mecanismos de defensa mecánicos, como la formación de espinas, aumento en el grosor de las hojas, presencia de tricomas, etc. Además de cambios fenológicos como la rápida reposición de biomasa perdida y ajustes de su ciclo biológico para evitar condiciones de estrés y químicos (Vivanco *et al.*, 2005; Oliveros, 2008).

Los metabolitos secundarios constituyen un conjunto de moléculas orgánicas con características particulares, sintetizadas en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, en ocasiones restringidos a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (García & Pérez, 2009; Leyva *et al.*, 2012a). Estos metabolitos secundarios cumplen funciones que no resultan vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo, constituyéndose en defensas químicas, responsables de la transmisión de información química de las plantas con su entorno, e incluyen la interacción planta-planta, planta-insectos y planta-microorganismos (García & Pérez, 2009; Ringuet & Viña, 2013).

Se conocen aproximadamente 20.000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógenos incluyen alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). De acuerdo a los principios activos de los metabolitos secundarios, se agrupan en cuatro clases principales: terpenos (hormonas, pigmentos y aceites esenciales), compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), glicósidos (saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y alcaloides (García & Pérez, 2009). Esta gran diversidad química y la intensa actividad biológica de estos componentes han despertado el interés por estas sustancias, de las cuales un gran número tiene actividad biológica reportada y un amplio potencial medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (García & Pérez, 2009; Pérez & Jiménez, 2011).

Los aceites esenciales pueden estar localizados en glándulas, pelos, sistema vascular, hojas, tallos, flores, raíces y/o frutas dependiendo de la especie vegetal. Los aceites esenciales (o la fracción volátil del aceite esencial) tienen fuertes componentes aromáticos, con un olor y sabor característicos, lo cual les confiere funciones específicas, constituyéndose en un mecanismo de defensa de las plantas, bien sea para atraer o repeler insectos y proteger contra el calor o el frío (Koul *et al.*, 2008; Leyva *et al.*, 2012a). Son una compleja mezcla de cerca de 100 metabolitos secundarios, los cuales se pueden

clasificar desde el punto de vista químico de acuerdo a sus componentes mayoritarios en compuestos terpénicos (principalmente monoterpenos compuestos de tres unidades llamadas sesquiterpenos), sesquiterpenoides (sesquiterpenos) y los fenilpropanoides (fenilpropanos)(García & Pérez, 2009; Leyva *et al.*, 2012a). La composición química de un aceite esencial puede variar a nivel intraespecífico dependiendo del genotipo, condiciones de extracción y factores ambientales (condiciones climáticas, localización geográfica y fecha de recolección), pudiendo clasificarse en variedades, ecotipos y/o quimiotipos diferentes (Santana *et al.*, 2012).

Los AEs pueden obtenerse de hojas, raíces, pericarpio del fruto, semillas, tallo, flores y de los frutos de unas 60 familias de plantas, como Compositae, Labiatae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, Umbelliferae, etc. Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de las familias Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales (Leyva *et al.*, 2012a). Entre los principales métodos de extracción de los AEs se encuentran la hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, hidrofusión, extracción con dióxido de carbono y microondas (Stefanazzi, 2010).

4.5. BIOPROSPECCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

-Bioactividad. Se ha encontrado que los AEs son útiles en el control de insectos que presentan resistencia a algún insecticida sintético. A diferencia de los pesticidas comerciales, los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos que incluyen algunas decenas a cientos de diferentes tipos de moléculas, las cuales actúan de manera sinérgica como una defensa estratégica para las plantas que los producen, por esta razón dificultan el desarrollo de la resistencia (Feng & Isman, 1995; Pavela *et al.*, 2014). El número de especies de plantas que pueden proveer aceites esenciales es alto, catalogándose como importantes recursos de insecticidas, que pueden ser eficientes frente a una amplia gama de insectos (Santana *et al.*, 2012).

En el control de vectores de enfermedades, los AE han mostrado numerosos tipos de efectos: ovicida, larvicida, adulticida, repelente, atrayente y deterrente (Mathivanan *et al.*, 2010; Ponnusamy *et al.*, 2010; Aciole *et al.*, 2011; Baldeón, 2011; Govindarajan & Sivakumar, 2011; Elango *et al.*, 2012; El-Gendy y Shaalan, 2012; Leyva *et al.*, 2012a; Gokulakrishnan *et al.*, 2013; Suman *et al.*, 2013). Sukumar *et al.*, (1991) y Vargas (2012) publicaron revisiones de literatura sobre el control de mosquitos (Diptera: Culicidae), mediante el uso de AEs de plantas con efectos en diferentes estadios de desarrollo. En ellas se incluye un cuadro sobre algunos AE de origen botánico, sus actividades contra los mosquitos y las referencias correspondientes.

- **Modo y mecanismo de acción.** Debido a la variabilidad en la composición química de los AEs, la cual cambia no solo de manera inter-especifica, sino intra-especifica, son capaces de interactuar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas, lo que les confiere una gran multifuncionalidad representada en la toxicidad en los insectos. Vásquez *et al.*, (2007) mencionan que los AEs actúan como reguladores del crecimiento evitando que alcance el estado adulto; como inhibidores de la alimentación al bloquear la absorción de nutrientes básicos, desencadenando la muerte por inanición. También son capaces de ejercer un efecto semioquímico, representado en un efecto repelente, atrayente e inhibidor de ovoposición debido a la multiplicidad de sus componentes volátiles (Koul *et al.*, 2008).

La naturaleza lipofílica de los componentes de los AEs facilita su acción en las funciones metabólicas, bioquímicas, fisiológicas y comportamentales de los insectos (Maheswaran & Ignacimuthu, 2012). Algunos monoterpenos, actúan sobre los receptores de la octopamina, lo cual los convierte en productos altamente selectivos dado que este tipo de receptores no están presente en los vertebrados (Enan, 2001), siendo el sistema octopaminérgico un blanco biorracional para su control (Espitia, 2011).

Lima *et al.* (2012) demostraron experimentalmente que los AE y lectinas (hidratos de carbono y proteínas hemaglutinadas) tienen un efecto deletéreo en diferentes tejidos, como en la interacción de la lectina con residuos de quitina N-acetylglucosamina, encontrada en el hemocele, en las cutículas epidermales y en las tráqueas. Algunos

poseen mono y sesquiterpenos con hidratos volátiles que pueden funcionar como xenobióticos en mosquitos (Demircia *et al.*, 2013). Pavela *et al.* (2014), describen que algunos aceites alteran la ovoposición, fomentan la disuasión de alimentación y la repelencia de *S. aegypti* ya sea mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa o mediante antagonistas de los receptores de octopamina. Neiro *et al.* (2010), mencionan que la diversidad de grupos funcionales de los AEs pueden actuar de manera sinérgica, tal como ocurre con la actividad repelente, relacionada con la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos.

Aunque la evaluación de la actividad de los aceites esenciales sobre insectos aun no contempla la estandarización de líneas de susceptibilidad, Días & Coutinho (2014) describen que para considerar como activo un producto natural, su concentración CL_{50} no debe ser mayor 100 mg.L^{-1} y que compuestos con concentraciones CL_{50} menores a 50 mg.L^{-1} son considerados como muy activos. Esta línea base es de suma importancia en estudios de bioactividad, pues contribuye a optimizar el modo y mecanismo de acción de los AEs con miras a perfeccionar su uso potencial como sustancias controladoras de diferentes especies de insectos de importancia para el ser humano.

4.6. SALVIA

El género *Salvia* (Lamiaceae), comprende aproximadamente 900 especies distribuidas por el mundo. Algunas de ellas como *Salvia lavandulifolia* (Vahl 1804) (antes subespecie de *Salvia officinalis* Linneo 1753), *Salvia sclarea* (Linneo 1753) y *Salvia fruticosa* (Mill 1768) tienen valor económico ya que se utilizan como especias y agentes aromatizantes en la perfumería y la industria. Otras especies, como *Salvia officinalis* y *Salvia lavandulifolia* también han sido empleadas durante mucho tiempo en la medicina popular, presentando diferentes usos, como por ejemplo en medicamentos contra la fiebre, reumatismo, transpiración, debilidad sexual, tratamiento de la bronquitis crónica, enfermedades mentales y nerviosas (Abu *et al.*, 2013).

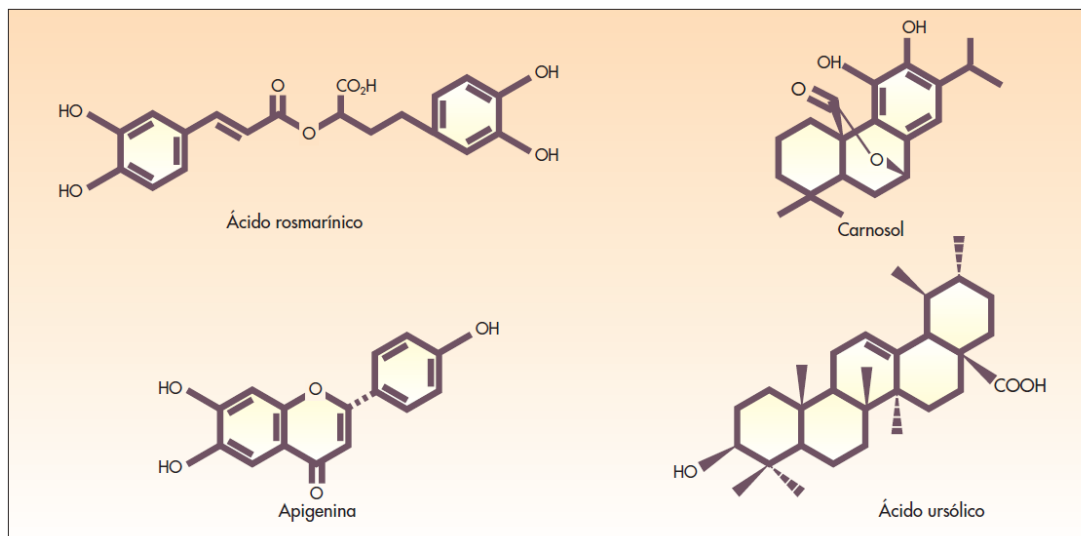
Salvia officinalis (salvia común) es un arbusto perenne, con tallos leñosos, hojas grisáceas y flores de color azul o púrpura. Es nativa de la región Mediterránea y en la

actualidad se cultiva en diferentes países (Porte *et al.*, 2013; Abu *et al.*, 2013). En Colombia se reportan 66 especies de la familia Lamiaceae (Labiatae) de uso medicinal, de las cuales el género *Salvia* es el más representativo con 15 especies, 7 de ellas consideradas exclusivas. A pesar de que *S. officinalis* es una planta foránea, su amplia distribución en el país contribuye a su uso en la medicina popular, considerándose una planta foránea naturalizada (Bernal *et al.*, 2011).

Todas las salvias presentan una composición química compleja con abundantes metabolitos de naturaleza terpénica: monoterpenos y sesquiterpenos constitutivos de sus aceites esenciales, diterpenos (carnosol, rosmanol, epirosmanol, ácido carnósico) y triterpenos derivados del ursano y oleanano. Además posee abundantes compuestos fenólicos: flavonoides con sustituyentes sobre el C-6 y ácidos fenólicos, principalmente ácido rosmarínico (Kintzios, 2000; Raal *et al.*, 2007; Pierozan *et al.*, 2009; Arias, 2012; Fu *et al.*, 2013).

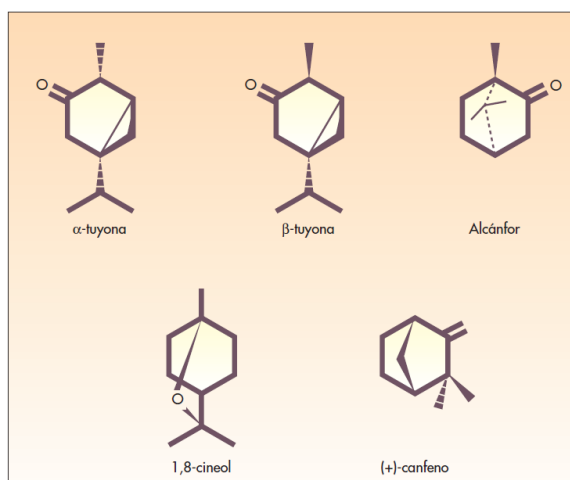
En relación a la composición química de *S. officinalis*, el aceite esencial tiene un porcentaje de rendimiento de 0,8-2,5%, compuesto por taninos condensados (3-7%, salviatanino), ácidos fenólicos (rosmarínico, cafeico, clorogénico, ferúlico, etc.), flavonoides (1-3%, luteolina, apigenina, genkwanina, hispidulina, cirsimaritina, 5,6,7-4'-tetrametoxiflavona[5-O-metilsalvigenina], nepetina, cirsilol y sus heterósidos), a-D-glucósidos de timol, mentol y tujol, diterpenos (carnosol, ácido carnósico y rosmanol), triterpenos (α -amirina y β -amirina, betulina y ácido sursólico y oleanólico y sus derivados hidroxilados), fitosteroles (b-sitosterol, estigmasterol) (Figura 1) (Hernández *et al.*, 2013; Abu *et al.*, 2013).

Figura 1. Componentes químicos de *S. officinalis*. Tomado de Hernández *et al.* (2013)



Los componentes mayoritarios del aceite esencial son por lo general cetonas monoterpénicas bicíclicas: α -tuyona, y en menor proporción, β -tuyona (Figura 2). Además contiene alcanfor, 1,8-cineol y borneol libre y esterificado. Sin embargo, la composición de este aceite esencial varía considerablemente según el órgano vegetal utilizado en la extracción y la estación del año en que se haya recolectado (Santana *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2013; Porte *et al.*, 2013).

Figura 2. Componentes químicos del aceite esencial de *S. officinalis*. Tomado de Hernández *et al.* (2013).



4.6.1. Propiedades biológicas de *S. officinalis*. A esta planta se le han atribuido numerosas actividades farmacológicas en la medicina tradicional, entre las que resaltan su actividad antibacteriana, fungistática y virostática. En el hombre puede tener actividad astringente e inhibidora de la sudoración (Hernández *et al.*, 2013). Los preparados de hoja de Salvia se emplean principalmente por vía externa en inflamaciones e infecciones de las mucosas bucofaríngeas (gingivitis, estomatitis, faringitis) y por vía interna (infusión oral) en el tratamiento de trastornos dispépticos, flatulencias, inflamaciones de las mucosas intestinales y diarreas. Otra de sus aplicaciones es como emenagogo, rebajando ligeramente los dolores de la menstruación; como hipoglucemiante, relajante muscular, combate el insomnio, aumenta la fertilidad (por su contenido en zinc está relacionado con la producción de testosterona), para combatir el Alzheimer (la Salvia ayuda a la conservación de la acetilcolina, uno de los principales neurotransmisores) y como vulnerario, curando las llagas y heridas (Sánchez *et al.*, 2005; González, 2009).

Los efectos secundarios pueden aparecer en caso de sobredosis (más de 15 g de hoja de Salvia por dosis) o de uso prolongado. La tujona, componente tóxico del aceite esencial, produce síntomas como taquicardia, sensación de calor, calambres y sensación de vértigo y convulsiones de tipo epiléptico (González, 2009).

Las propiedades antibacterianas del AE de *S. officinalis* contra *Listeria monocytogenes* Pirie 1940, *Bacillus cereus* K Chester 1901, *Bacillus subtilis* Cohn 1872, *Escherichia coli* Castellani y Chalmers 1919, y *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (Porte *et al.*, 2013) se han atribuido a la presencia de 1,8-cineol y alcanfor (Abu *et al.*, 2013). En Colombia, López *et al.* (2013) evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *S. officinalis* sobre microorganismos transmitidos por alimentos con alto potencial patogénico en humanos, encontrando un amplio espectro de inhibición microbiana sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos (concentración inhibitoria mínima (CiM) entre 1 y 4 mg.ml), demostrando que este AE puede ser utilizado para mejorar la esterilidad y tiempo de vida útil de productos alimenticios.

Estudios realizados en animales de experimentación (Íleon de cobaya – *Cavia porcellus*) han demostrado la actividad espasmolítica del aceite esencial, debido a la presencia de

alcanfor y acetato de bornilo. El extracto hidroalcohólico es capaz de inhibir las contracciones inducidas por serotonina y acetilcolina, que se debe al efecto a los compuestos fenólicos (Hernández *et al.*, 2013). Nedic *et al.* (2013), mediante ensayos de laboratorio probaron el efecto tóxico del AE de *S. officinalis* sobre abejas comunes *Apis mellifera* Linnaeus 1758 (Hymenoptera: Apidae), con el fin de emplearlo de manera segura contra patógenos. Los investigadores observaron que el AE de salvia presentó efectos tóxicos pronunciados a las 24 horas de exposición en dosis de 5 a 64 μL .

En relación a su uso contra mosquitos son escasos los trabajos publicados al respecto. Kang *et al.*, (2009), evaluaron la repelencia de 33 AEs de diferentes géneros de plantas en hembras adultas de *Culex pipiens* Linnaeus 1758 (Diptera: Culicidae) (a concentraciones de 0.005 mg/cm^2), encontrando que para *S. officinalis*, el porcentaje de repelencia fue de 22%. En este sentido, este trabajo presentado aquí sería el primer estudio que se realiza en *S. aegypti* en todos los estadios de desarrollo y con investigación en el mecanismo de acción.

Zoubiri & Baaliouamer (2011), listan una revisión de los datos publicados en los últimos 10 años sobre plantas aromáticas y AE que han sido reportados con actividad insecticida. En el listado aparecen 8 especies del género *Salvia*: *S. farinácea* (Ellis & Barthol 1897), *S. glutinosa* (Linneo 1753), *S. officinalis*, *S. pomífera* (Linneo 1753), *S. ringens* (Sibthorp & Smith 1806), *S. verbenaca* (Linneo 1753), *S. viridis* (Linneo 1753) y *S. sclarea* (Linneo 1753). De los trabajos mencionados, *S. officinalis* cuenta con dos publicaciones, la primera de ellas de Choi *et al.* (2006) quienes evalúan diferentes aceites esenciales sobre *Lycoriella mali* Fitch, 1856 (Diptera: Sciaridae), y la segunda, de Pavela (2008), quien evalúa el efecto larvicida de 56 especies de plantas contra *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae). Pavela (2008) reporta que todas las plantas mostraron un efecto larvicida después de las 24 horas de exposición a una dosis máxima de 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Con respecto a *S. officinalis* reporta un porcentaje de mortalidad de 84.6 ± 10.2 , con una CL_{50} de 159 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Es bien conocido que el exceso tanto de las especies reactivas (RS), como las especies reactivas de oxígeno (ROS), ocasionan un incremento de la permeabilidad celular, pérdida

de función de enzimas y lesiones en el ADN en diferentes tipos de organismos (Arias, 2012; Russo *et al.*, 2014). Aun cuando son escasos los reportes que describan el efecto directo de los aceites esenciales en el material genético de insectos, si existen reportes frente a la descripción de las propiedades antioxidantes *S. officinalis*, al tener la capacidad de capturar radicales libres e inhibir la oxidación lipídica, contribuyendo a mantener la integridad del núcleo, ADN mitocondrial y proteínas citoplasmáticas (Almeida *et al.*, 2014).

5. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la actividad biológica y mecanismo de acción del aceite esencial de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae).

ESPECIFICOS

Relacionar el análisis *in silico* de *Salvia officinalis* con la acción biocida frente a *Stegomyia aegypti*.

Evaluar la actividad ovicida, larvicida, pupicida, adulticida, repelente y repelencia a la ovoposición del aceite esencial de *Salvia officinalis* frente a *Stegomyia aegypti*.

Determinar la presencia/ausencia de degradación de ADN total de *Stegomyia aegypti* con la aplicación del aceite esencial de *Salvia officinalis*.

Evaluar la inhibición de la acetilcolinesterasa en *Stegomyia aegypti* con la aplicación del aceite esencial de *Salvia officinalis*.

Determinar alteración en la función mitocondrial del aceite esencial *Salvia officinalis* frente a *Stegomyia aegypti*.

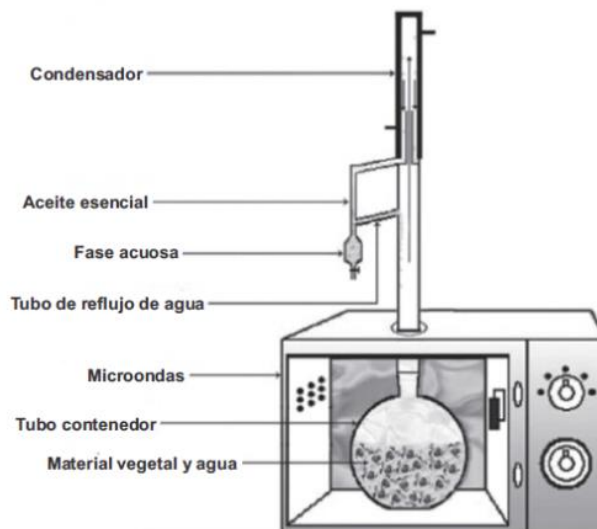
6. MATERIALES Y METODOS

6.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El AE de *Salvia officinalis* fue suministrado por el Centro de Investigación en biomoléculas (CIBIMOL) y el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM). Ambos centros de investigación adscritos a la Universidad Industrial de Santander. La extracción del aceite esencial así como su caracterización química se llevó a cabo utilizando el protocolo reportado por Stashenko *et al.* (2004).

El AE fue extraído de 500 g de planta completa, por hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD). La HD se realizó en un matraz de fondo redondo (de 5 L) con el material vegetal y 4 L de agua destilada, utilizando un calentador eléctrico (agua a ebullición) durante 2 horas. El aceite se decantó del condensado, previamente saturado con NaCl, y se secó con sulfato de sodio anhidro. Para la MWHD, el aparato de hidrodestilación se colocó dentro de un horno de microondas doméstico (2.45 GHz, 800 W) con un orificio lateral a través del cual se conecta un condensador de vidrio externo al matraz de fondo redondo con el material vegetal (500 g) y agua (0,2 L), en el interior del horno. El aparato fue operado durante 30 minutos a la máxima potencia, lo cual causó que el agua hirviera vigorosamente hasta mantener su reflujó. El AE se acumuló en una trampa Dean-Stark, posteriormente se decantó el condensado y se secó con sulfato de sodio anhidro. El AE se almacenó a 4°C en las instalaciones del Centro de investigaciones en enfermedades Tropicales (CINTROP).

Figura 3. Método de extracción hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), empleado por el CENIVAM para la obtención del aceite esencial de *Salvia officinalis* (Tomado de Stefanidis *et al.*, 2014).



6.2. ANÁLISIS *IN SÍLICO*

Se realizó el cribado virtual de los componentes mayoritarios del AE de *S. officinalis* empleando los programas OSIRIS Property Explorer en línea (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) y Molinspiration Cheminformatics Software en línea (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). En cada uno de ellos se dibujó la estructura del compuesto de interés, permitiendo conocer propiedades relacionadas con el potencial para penetrar membranas biológicas (Parámetros de Lipinski) y localizar fragmentos dentro de la molécula que indiquen un potencial riesgo de toxicidad. Las alertas se generan para mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos irritantes y efectos teratogénicos; y son clasificados por el grado del riesgo (alto, medio y bajo).

6.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Los bioensayos fueron realizados con una colonia Rockefeller de *S. aegypti*, mantenida en jaulas de cría (40x40x40 cm) en insectario a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo (12:12) (Figura 4a). A las hembras de *S. aegypti*, se les ofreció

permanentemente una solución azucarada de miel al 10%. Cada ocho días, dependiendo de la necesidad de material biológico, se suministró a las hembras alimentación sanguínea para la obtención de huevos utilizando rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza Wistar WI IOPS AF/Han, facilitada por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander (Figura 4b), cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia (Anexo A. Consideraciones Éticas).

Para sincronizar la eclosión de los huevos se retiró el papel filtro y se dejó secar por tres días a temperatura ambiente para la maduración de los embriones; luego de este periodo, se estimuló su eclosión al sumergirlos en agua para obtener el material de los experimentos. Las larvas de la colonia madre se mantuvieron en bandejas plásticas en un numero constante y se alimentaron con concentrado para peces TetraMin Tropical Flakes®.

Figura 4. a. Colonia Rockefeller de *S. aegypti*, mantenida en condiciones de cría en la Sede UIS Guatiguará. **b.** Rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza Wistar empleada para alimentar la colonia. (Fotos: Autor).



a.



b.

6.4. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

6.4.1. Actividad ovicida. Para los bioensayos de actividad ovicida, se adoptaron las metodologías propuestas por Su & Mulla (1998) y Summan *et al.* (2013).

- *Efecto de las concentraciones de S. officinalis y actividad ovicida*

Para este bioensayo dosis-respuesta se separaron 20 hembras grávidas en una jaula de seguridad de 40x40x40. Se utilizaron seis vasos desechables de 200 mL con 50 mL del AE de *S. officinalis* a diferentes concentraciones (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹) y un vaso control (49mL de agua + 1 mL de DMSO al 0.5%). Posteriormente se marcaron e introdujeron papeles filtro Whatman ® # 1 cortados a la mitad y doblados a manera de cono, con el fin de revestir internamente las paredes del vaso y permitir la posterior recolección y conteo de los huevos. Los vasos se colocaron en la jaula junto con las hembras grávidas para permitir la oviposición por un periodo de 10 horas durante 8 días consecutivos, retirándose el papel filtro todos los días. Cada vez que se llevó a cabo una réplica del experimento, se seleccionaron nuevas hembras y se prepararon nuevamente las concentraciones del AE.

De la ovipostura, se seleccionaron al azar 50 a 100 huevos por vaso, teniendo en cuenta el tiempo después de su ovoposición: huevos frescos, recolectados de 0 a 12 horas de ovoposición; y embrionados, huevos recolectados después de 72 horas. Los huevos secos fueron transferidos a recipientes individuales de acuerdo con la concentración evaluada para ser contados y examinados bajo un estereoscopio con el fin de garantizar la integridad de los mismos. Este ensayo se realizó en diferentes días por triplicado. Se evaluó el porcentaje de eclosión de los huevos hasta 120 horas después de la ovoposición (Número total de larvas eclosionadas/número total de huevos examinados), sumergiendo los huevos obtenidos por cada concentración en agua libre de cloro. Las larvas de primer instar fueron contadas bajo un microscopio de disección.

Los huevos no eclosionados después de siete días de duración del ensayo, fueron considerados como muertos. La Inhibición de la eclosión de los huevos se calculó como el porcentaje de huevos sin eclosionar.

- *Efectos sobre el desarrollo embrionario y el patrón de eclosión*

Se seleccionó una muestra de huevos frescos (recolectados de 0 a 12 horas de ovoposición) y embrionados (huevos recolectados después de 72 horas) provenientes de los vasos tratados a diferentes concentraciones (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹), con el fin de determinar si el AE induce un efecto regulador de crecimiento en el desarrollo embrionario. El número de huevos seleccionados por cada concentración y tiempo de exposición, fueron expuestos a 80% de Hipoclorito de sodio por 10 a 20 min hasta que la cáscara del huevo quedo transparente. Los huevos clareados se examinaron bajo microscopio con el fin de buscar anomalías morfológicas causadas por la exposición al AE como cambios morfológicos en la cáscara de huevo, desarrollo de patrones deformes en el embrión y eclosión de huevos anormales. Las potenciales anomalías fueron registradas para el cálculo del porcentaje de anomalías de acuerdo a los tiempos de recolección de los huevos.

6.4.2. Actividad larvívora. Se pusieron a eclosionar huevos de *S. aegypti* en agua mineral libre de cloro obtenida por osmosis inversa (EC106M-P), adicionándole alimento para peces marca TetraMin Tropical Flakes ®. Cuando las larvas emergidas se encontraron en estado Larval 3 (L3) y final de Larval 4 (L4), 10 de ellas se transfirieron individualmente a vasos plásticos de 200 mL con 99 mL de agua libre de cloro. A cada vaso se adiciono 1mL del AE de *S. officinalis* (volumen final: 100 mL). Inicialmente se realizó un *screening* selectivo con concentraciones diagnósticas (CD) de 30, 300 y 1000 mg.L⁻¹. Para la selección de las concentraciones experimentales fueron tomados los porcentajes de mortalidad obtenidos de las concentraciones diagnósticas, teniendo en cuenta valores medios de mortalidad, de esta manera, se establecieron nuevos bioensayos dosis-respuesta a diferentes concentraciones (30, 47, 51, 63 y 76 mg.L⁻¹). Se realizaron pruebas por cuadruplicado, para cada concentración evaluada, las cuales fueron repetidas por triplicado en días diferentes. Como grupo control se utilizó DMSO al 0.5%. En cada ensayo fue registrada la mortalidad a las 24 y a las 48 horas, considerando como muertas aquellas larvas que no presentaron movimiento o que no reaccionaron cuando el agua fue agitada. Los resultados de mortalidad y supervivencia fueron sometidos a análisis Probit (Finney, 1971).

6.4.3. Actividad pupicida. Se utilizaron 20 pupas previamente sincronizadas de 12 a 24 horas después de pasar por el cuarto instar larval. Cinco pupas fueron transferidas a vasos plásticos con 39 mL de agua mineral obtenida por osmosis inversa (EC106M-P). A cada vaso se adiciono 1mL de AE de *S. officinalis* (volumen final: 40 mL). Inicialmente se realizó un *screening* selectivo con concentraciones diagnósticas (CD) de 30, 300 y 1000 mg.L⁻¹. A partir de esta evaluación se establecieron las concentraciones experimentales de 250, 310 y 390 mg.L⁻¹. Se realizaron pruebas por triplicado para cada concentración evaluada, más el grupo control (DMSO al 0.5%). La actividad pupicida se determinó con el porcentaje de pupas muertas en un periodo de 24 horas, posterior confirmación a las 48h. Cada pupa fue considerada muerta si no presentaba ningún movimiento bajo estímulos externos.

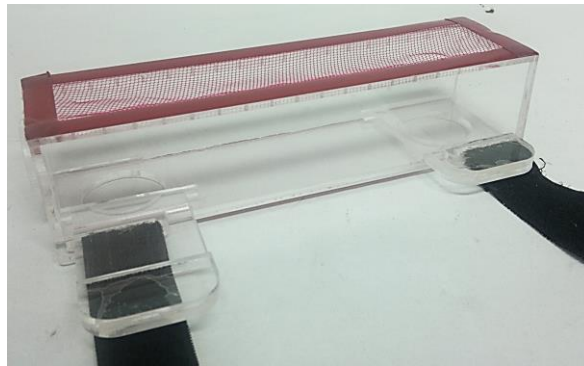
6.4.4. Actividad adulticida. Fue evaluada de acuerdo a la metodología de botella del CDC (Brogdon & McAllister, 1998). Se lavaron y secaron botellas de vidrio tipo *Wheaton* de 250 mL para impregnarlas con 1mL de la solución de AE de *S. officinalis* a 30, 300 y 1000 mg.L⁻¹, como grupo control se utilizó 1mL de cetona. En cada botella se introdujeron 10 individuos (machos y hembras) y cada concentración fue evaluada por triplicado. La actividad adulticida se registró cada 15 minutos hasta completar tres horas, además, se calculó el porcentaje de mortalidad en un periodo de 24 horas después del bioensayo.

6.4.5. Actividad repelencia a la picada de los mosquitos. Se usaron 20 hembras de *S. aegypti* de 5-10 días de emergidas, copuladas, grávidas, nulíparas, alimentadas exclusivamente a base de glúcidos de acuerdo a la metodología propuesta por *The American Society for Testing and Materials* (ASTM) (2000) y con el método ASTM-E951-94 para bioensayos de repelencia (Barnard *et al.*, 2007).

En esta prueba se emplearon los dos brazos de un voluntario bajo previo consentimiento informado (Anexo C), marcando un área de 4cm², el brazo derecho se utilizó para evaluar 1mL del AE de *S. officinalis* a una única concentración de 1000 mg.L⁻¹ y el izquierdo para el tratamiento control, 1mL de cetona a 99%. Posterior a la aplicación de los dos tratamientos, se esperó 20 minutos (tiempo de secado). Se emplearon dos dispositivos de

acrílico rectangulares (18cm largo x 5cm de ancho x 4 cm de alto) (Figura 5) con el fin de contener a las hembras para el experimento. Se empleó el dispositivo modificado CINTROP (2013), con únicamente dos agujeros de apertura de 29 mm de diámetro en sus extremos inferiores, de tal manera que solo una sección del antebrazo del voluntario quedara expuesta a los mosquitos. Se registró el número de picadas y de aterrizajes a los 0 minutos, 2 minutos, y posteriormente a intervalos de 15 minutos.

Figura 5. Dispositivo de acrílico modificado por CINTROP (2013) para la evaluación de la actividad de repelencia a la picada de mosquitos (Foto: Autor).



Se llevaron a cabo cuatro réplicas de cada experimento en días diferentes, empleando cuatro voluntarios para cada prueba. De esta manera, el tiempo de exposición total al que se expone cada voluntario a la prueba es de 1 hora como tiempo máximo. En todos los experimentos se estimó el porcentaje de repelencia mediante la modificación de la fórmula propuesta por Phasomkusolsil y Soonwera (2011) en intervalos de tiempo de 0-2 minutos, de 3 a 15 min y de 15 min en adelante, así:

$$\% \text{ Repelencia} = \frac{N_t}{N_t + N_c} \times 100$$

Dónde: N_t = Número de picadas en el tratamiento; N_c = Número de picadas en el control. Adicionalmente, se calculó el porcentaje de picadura (Tawatsin *et al.*, 2001; Thavara *et al.*, 2001).

6.4.6. Actividad deterrente. Se utilizaron vasos de 30 mL, cada uno con 15 mL de agua libre de cloro. En cada vaso se adiciono 75 μ L de AE de *S. officinalis* (volumen final: 15mL), a diferentes concentraciones (5, 50 y 200 mg.L⁻¹) y un vaso control (14,25 mL de agua + 75 μ L de DMSO al 0.5%). Posteriormente se marcaron e introdujeron papeles filtro Whatman ® # 1 cortados a la mitad de forma manual y doblados a manera de cono, con el fin de revestir internamente las paredes del vaso y permitir la posterior recolección y conteo de los huevos.

Los vasos fueron depositados en una jaula de seguridad de 40x40x40 cm, con 10 hembras nulíparas grávidas y con el abdomen visiblemente hinchado por la alimentación sanguínea. El seguimiento de preferencia de ovoposición fue evaluado pasado dos días de la alimentación con sangre de la colonia. Debido a que la ovoposición ocurre solo después de la alimentación y va del día 2 al 7, cada 24 horas se cambiaron los vasos manteniendo las respectivas concentraciones, rotándolos al interior de las jaulas en dirección contraria a las manecillas del reloj. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió durante cuatro días diferentes, contando el número de huevos puestos por día, a lo largo de 6 días.

Para esta prueba fue evaluada la preferencia de hembras grávidas de *S. aegypti* a oviponer, mediante el índice de ovoposición (OAI) delimitado de +1 a -1 (Kramer & Mulla, 1979). Los criterios para determinar estadísticamente la atracción o repelencia fueron: Valores positivos indican la ocurrencia de más huevos en los tratamientos que el control, de esta manera se puede afirmar que existe atracción a oviponer. Mientras que más huevos colocados en el control indica que la acción se considerada como deterrente. Como lo sugiere Kramer & Mulla (1979), compuestos con OAI (Índice de actividad de la ovoposición) mayores o iguales + 0.3 pueden considerarse como atrayentes y menores o iguales a -0.3 se consideran como repelentes. Se calculó el porcentaje de repelencia y los resultados fueron sometidos a análisis de varianza de una vía.

6.5. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

6.5.1. Determinación de la presencia/ausencia de degradación de ADN total de *Stegomyia aegypti*. Con el fin de conocer si el AE ejerce algún efecto en el ADN del mosquito, se verificó la degradación de ADN total de *S. aegypti* empleando larvas del estado larval 3 (L3) y final de larval 4 (L4). El ADN se extrajo siguiendo el protocolo del Kit de extracción ULtraClean® Tissue & Cells de Laboratorios MO BIOS Inc (Anexo B).

Para la ejecución de la técnica, fue necesario preparar *Buffer TBE 1X* (Para 1 litro de solución: 16,864g de TBE 10X aforado con agua destilada, pH a 8.0 con HCL) y el gel de *Agarosa 1%* (0,5 g de agarosa disueltos en 50 mL de TBE 1X), al cual se le adicionó el agente colorante de ADN SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Se vertió la solución en una cubeta previamente preparada y una vez se solidificó, se añadió el tampón de electroforesis *TBE 1X*, de forma que el gel de agarosa quede completamente cubierto. Como marcador de peso molecular, se utilizó HyperLadder® 1kb (Bioline) de 200 a 10000 pb.

Se realizó un diseño experimental que contemplo el desarrollo de tres replicas en días diferentes, con tres variaciones en el tiempo de exposición al AE: larvas expuestas durante 24 horas; el AE adicionado en el momento de la homogenización de las larvas, previa purificación del ADN; y AE adicionado directamente sobre ADN puro. Las condiciones de corrida de la electroforesis fueron: 100 Voltios y 85 miliamperios durante 70 minutos. Una vez se completó el tiempo de corrida, el gel fue observado en un transiluminador ENDURO GDS TOUCH® de 302 nm (Labnet International, Inc.).

a. Extracción de ADN de larvas tratadas con el AE

Con el fin de conocer si el AE es capaz de producir daño en el ADN al estar disuelto en el medio natural de las larvas, se siguió la misma metodología del apartado “Actividad larvicida”, donde se emplearon larvas previamente tratadas durante 24 horas con el AE de *S. officinalis* a CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀ para la extracción de ADN. El control positivo fue evaluado con larvas tratadas por 24 horas con Campotepecina (CPT) 4 µM (Alcaloide citotóxico que inhibe la topoisomerasa 1 del ADN) (Kumar *et al.*, 2008), adición de CPT en

el momento de realizar la homogenización de las larvas, previa extracción del ADN; y adición de CPT en el momento de sembrar los pozos (directamente en el ADN purificado). Después de 24 horas de exposición, cada *pool* de larvas por tratamiento fue homogenizado individualmente para continuar con el proceso de extracción de ADN (Figura 6A).

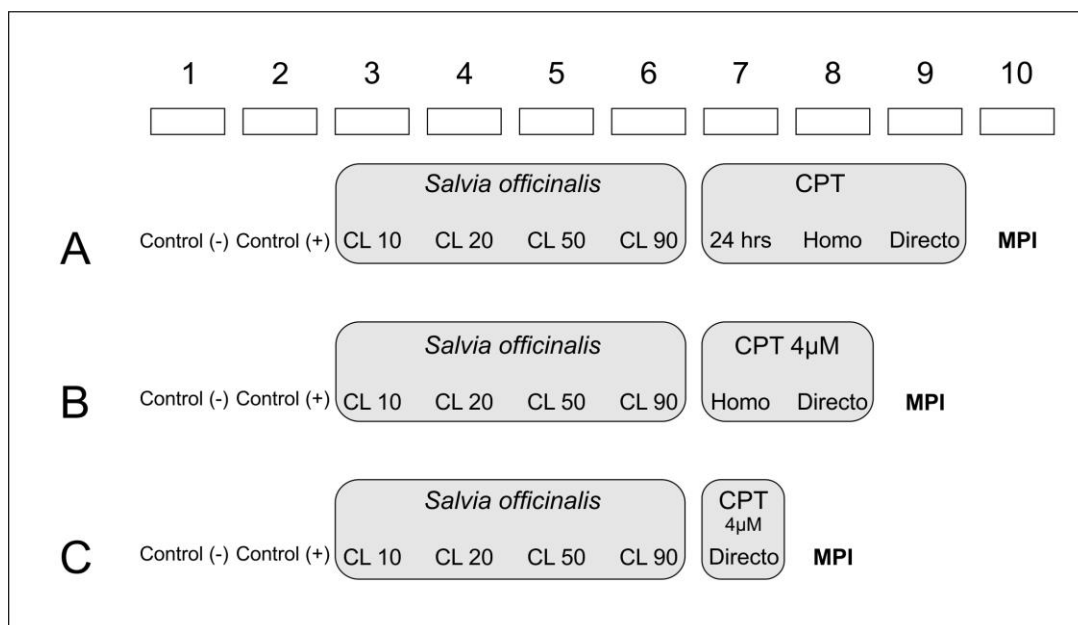
b. Extracción de ADN de larvas sin tratamiento previo con el AE

Se tomó un *pool* de larvas sin tratamiento previo y fueron separadas en 7 grupos. En el momento de la homogenización, a cada grupo se le adicióno una concentración del AE de *S. officinalis* a CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀ bajo un periodo de incubación de 2 horas. El control positivo CPT se adicionó al homogenizar las larvas y de manera directa en el ADN purificado antes de ser añadido en el pozo. También se empleó un control negativo, consistente en ADN sin tratar. El ADN obtenido de cada grupo fue almacenado en tubos *ependorf* para adicionar 1µL de muestra en el gel. Este experimento permite conocer si la acción del AE es capaz de degradar ADN en presencia de otras proteínas disueltas (Figura 6B).

c. ADN purificado y tratado directamente con el AE

Este experimento confirma si el AE de *S. officinalis* puede degradar ADN puro de larvas de mosquito. Para ello, se realizó una extracción de ADN de un *pool* de larvas sin tratar, con el fin de adicionar los tratamientos directamente en los pozos: AE de *S. officinalis* a CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀, CL₉₀, control positivo CPT directo y control negativo (ADN sin tratar). El tiempo de incubación fue de 5 minutos (Figura 6C).

Figura 6. Diseño experimental de la determinación de presencia/ausencia de degradación de ADN total de larvas de *S. aegypti*. **A.** Extracción de ADN de larvas tratadas con el AE; **B.** Extracción de ADN de larvas sin tratamiento previo con el AE; **C.** ADN purificado y tratado directamente con el AE. Control (-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Recuadro *Salvia officinalis*: Tratamientos con el AE a diferentes concentraciones (CL10, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀). Recuadro CPT (Camptotecina): CPT 24 hrs: ADN de larvas previamente tratadas con CPT; CPT Homo: El CPT se adiciono en el homogenato de larvas previo a la extracción de ADN; CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN.

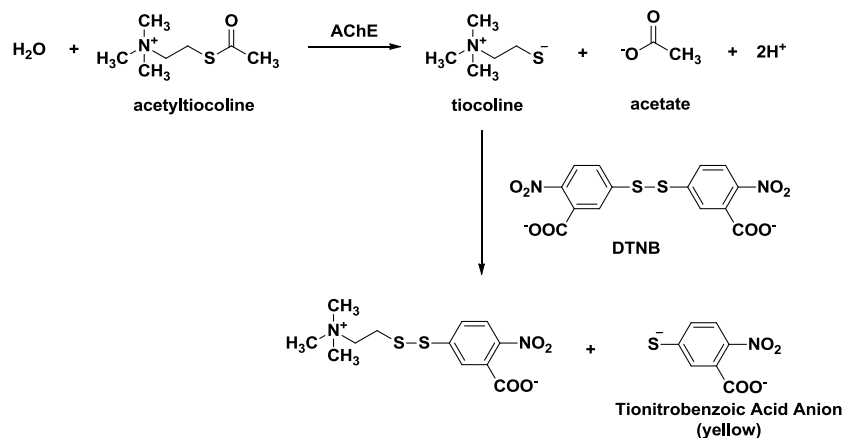


6.5.2. Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa. Para la evaluación de la acetilcolinesterasa se empleó el método de Ellman *et al.* (1961), cuyo principio se basa en un ensayo colorimétrico, donde en lugar de utilizar acetilcolina (compuesto que no presenta propiedades espectroscópicas) se utiliza acetil-tiocolina como sustrato alternativo. La actividad de la enzima es medida mediante el incremento del color amarillo producido por la tiocolina cuando reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).

La reacción ocurre de la siguiente manera: la acetiltiocolina se hidroliza por medio de la Acetilcolinesterasa, produciendo compuestos tiol. Estos compuestos son interceptados por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) formando un enlace disulfuro y liberando

un anión TNB de color amarillo. La formación de este compuesto se monitorea midiendo la absorción de la mezcla reaccionante a una longitud de onda de 450 nm (Ellman *et al.*, 1961) (Figura 7).

Figura 7. Esquema de la reacción del método de Ellman para la cuantificación de acetilcolinesterasa (Ellman *et al.*, 1961).



Para la ejecución de la prueba, se prepararon *Buffers* fosfato pH= 7.0 y pH=7.8, siguiendo el protocolo descrito por el Ministerio de Salud de Brasil y la Fundación Osvaldo Cruz (2006):

Solución Buffer de Fosfato de Sodio: Para obtener el pH requerido (7.0) se debe hacer una mezcla de dos soluciones de molaridad idéntica (monobásico NaH_2PO_4 y bibásico Na_2HPO_4), al hacer esta mezcla, la solución resultante (*Buffer*) tendrá la misma molaridad (recomendación del protocolo 1M).

Solución Tritón/Fosfato de Sodio: 1% de Tritón X-100 en 100mM de fosfato de sodio (pH=7.8). Para la solución stock de 500mL.

Solución DTNB/Fosfato de Sodio: 10 mM de DTNB en 100 mM de fosfato de sodio a Ph=7.0 (La solución se prepara máximo 4 horas antes del ensayo); para preparar 3mL de solución.

Preparación Propoxur: Solución 0.1M en acetona. Pesar 0.02092g de Propoxur (P.M= 209.24 g/mol). Agregar a 1mL de acetona. Preparar alícuotas de 100µL y mantener a 4°C. Para la solución Stock (1mL).

Para la preparación del sustrato se empleó una solución con NaH₂PO₄, DTNB, yoduro de acetiltiocolina, agua y se mantuvo protegida de la luz.

Para evaluar el efecto del aceite esencial de *S. officinalis* se evaluó la actividad del AE en la enzima comercial acetil-tiocolina. Para cada experimento se emplearon cinco diferentes concentraciones del AE para obtener el valor de Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀), además se realizó un control positivo utilizando Propoxur® como inhibidor de la enzima.

Se utilizaron microplacas de 96 pozos, para un volumen final de 200µL por pozo. En orden se adicionó el aceite esencial, *buffer*, enzima y sustrato. Posterior a la adición de la enzima se dejó incubar durante treinta minutos con agitación suave y se le agregó el sustrato, para finalmente realizar la lectura de los valores de absorbancia para cada placa a los 3 y 5 minutos, en un lector de microplacas Versamax.

6.5.3. Ensayo de evaluación del mecanismo de acción mitocondrial. Para la obtención de mitocondrias integras se modificó el protocolo para aislamiento de mitocondrias de hígado de ratón, propuesto por Méndez *et al.* (2009). Se seleccionaron aproximadamente 10 g de larvas en estadio Larval 3 (L3) y final de Larval 4 (L4). Se homogenizaron en un homogenizador Potter-Elvehjem en 3 mL de *Buffer* de aislamiento. El producto se filtró a través de lana de vidrio, se realizaron tres lavados con *Buffer* de aislamiento (Hepes 50 mM (Ph 7.4), EDTA 1 mM, Sacarosa 250 mM, Sulfato de Magnesio 5 mM y 2g.L de albúmina de suero bovino (BSA)) y se recogió en un tubo *eppendorf* de 1 mL. Las mitocondrias se separaron por centrifugación diferencial a 4°C. La primera centrifugación fue de 300 gravedades (g) por 5 min, donde se tomó el sobrenadante y se descarta el pellet. Una segunda centrifugación a 1000 g por 10 min, el pellet obtenido se re suspende suavemente en 1 mL de tampón de aislamiento. Una tercera centrifugación a 300 g por 5 minutos donde se toma el sobrenadante y se descarta el pellet. Y una cuarta

centrifugación a 10.000 g por 10 minutos donde se descarta el sobrenadante y se toma el pellet, el cual es re suspendido en medio de aislamiento sin BSA.

La concentración de proteína en todas las muestras se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford (1976), basado en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie 0-250 y aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro a 595 nm usando albúmina de suero bovino como patrón.

Las mitocondrias aisladas fueron utilizadas con el fin de determinar el Consumo de oxígeno/control respiratorio y conocer la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

Determinación del consumo de oxígeno/ control respiratorio: El consumo de oxígeno de las mitocondrias se determinó polarográficamente en un oxígrafo (*Medio Oxígrafo:* Hepes 10 mM (Ph 7.4), EGTA 0.1 mM, sacarosa 125 mM, KCL 65 mM). Los resultados se expresaron en nmol de O₂ consumido x min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, considerándose la solubilidad del oxígeno en agua a la temperatura usada y a 1 atm (Voss *et al.*, 1961). Solo fueron utilizadas mitocondrias con un control respiratorio (CCR) > = 3, ya que valores inferiores son indicativo de mitocondrias en mal estado.

Los efectos del aceite esencial de *S. officinalis* sobre la cadena respiratoria de larvas de *S. aegypti* fueron evaluados en tres concentraciones CL₁₀= 45 mg.L⁻¹; CL₂₀= 55 mg.L⁻¹ y CL₅₀= 80mg.L⁻¹. Cada una de estas concentraciones fue incubada durante 2 minutos junto con las mitocondrias, antes de la adición de sustratos energizantes (glutamato y succinato), evaluando los parámetros propios de la respiración mitocondrial: consumo de oxígeno en presencia de ADP (Estado 3), velocidad del consumo de oxígeno después del agotamiento del ADP (Estado 4) y coeficiente de control respiratorio (CCR). Cada uno de estos parámetros fue evaluado con dos sustratos independientes, glutamato (5mM) y succinato (3mM), con el fin de conocer el comportamiento del transporte de electrones desde los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial.

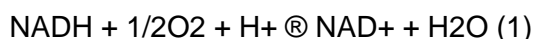
Coeficiente de Control respiratorio (CCR): El CCR es un parámetro que permite comprobar la integridad de una preparación de mitocondrias. Se define como el valor que se obtiene al dividir la velocidad de consumo de oxígeno que se observa cuando hay máxima síntesis de ATP (es decir en presencia de ADP o en presencia de un translocador de protones), entre la velocidad de consumo de oxígeno cuando no hay síntesis de ATP o en ausencia de un translocador de protones. Por lo tanto: $CCR = \frac{\text{Respiración estado 3}}{\text{Respiración estado 4}}$.

Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales: Las mitocondrias aisladas mencionadas se mantuvieron congeladas hasta el momento de su uso, donde se fragmentaron empleando sonicador Elmasonic Elma E30H durante 10 minutos y mantenidas en baño de hielo hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los fragmentos de membrana obtenidos fueron usados como fuente de enzimas.

Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena transportadora de electrones de la mitocondria: La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se realizó por espectrofotometría o polarográficamente en un oxígrafo. Se utilizaron mitocondrias fragmentadas para estudiar cada uno de los complejos mitocondriales y de esta manera conocer con mayor precisión en cuál de los complejos ocurre el daño ocasionado al emplear la concentración más alta evaluada: CL_{50} ($80\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) del AE de *S. officinalis*. Los resultados se reportaron en porcentaje de actividad de cada enzima, tomando como 100% la actividad correspondiente al ensayo en ausencia del AE (Control).

- *NADH Oxidasa*

La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer (1974). La velocidad de oxidación del NADH (reacción 1) se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.



El sistema de reacción consistió en tampón fosfato 80 mM (pH 7,4),

EDTA 50 mM, NADH 0,17 mM e 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción iniciada por la adición de NADH.

- *NADH Citocromo c reductasa* (EC 1.6.99.3-NADH)

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente por el método descrito por Somlo (1965), a través del monitoreamiento de la velocidad de reducción del citocromo C a 550nm. El sistema de reacción se constituye de: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NADH 50 mM, citocromo c (oxidado) 40 mM, NaCN 1 mM e 80 µg de proteína mitocondrial. Todos los reactivos excepto el citocromo c, se incubaron por 10 min a 28°C, la reacción se inició por la adición del citocromo c, siendo acompañada por lo menos durante 2 minutos a 550 nm.

- *NADH deshidrogenasa* (EC 1.6.5.3)

La actividad de la enzima se determinó por el método espectrofotométrico de Singer (1974), usando ferrocianato como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción se monitoreó a 420 nm (reacción 2).



El sistema de reacción se constituye de: tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2.0 mM, NADH 0.15 mM, ferrocianato 600 mM, rotenona 1 mM, NaCN 1 mM e 30 µg de proteína mitocondrial.

- *Succinato deshidrogenasa* (EC 1.3.5.1)

La actividad de la succinato deshidrogenasa se determinó por el método de Singer (1974), utilizando 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) y fenacino metosulfato (PMS) como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP se monitoreo a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, rotenona 1 mM, PMS 1 mM y 30 µg de proteína mitocondrial.

Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 minutos a 28°C, la reacción fue iniciada por la adición de DCPIP 180 mM.

6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los bioensayos y pruebas fueron realizados por triplicado en días diferentes, y cada concentración fue evaluada tres o cuatro veces. Los datos obtenidos fueron registrados en una base de datos de Excel discriminada para cada prueba.

Los resultados fueron analizados usando Statistica V11. A todos los datos tabulados se les aplicó estadística descriptiva (Promedio, desviación estándar, error) y fueron sujetos a test de normalidad. Cuando presentaron distribución normal, se les aplicó un ANOVA y posteriormente un test Tukey. Si la distribución no fue normal, se aplicaron pruebas no paramétricas. Se estableció la significancia estadística con valores de $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ANALISIS *in silico* DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial extraído y caracterizado en el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) y en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agro industrialización de Especies Vegetales Aromáticas (CENIVAM) presentó un rendimiento del 0,4%. Los componentes mayoritarios fueron identificados por comparación de los tiempos de retención mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y comparados con las bases de datos Nist, Wiley y Adams disponibles en la literatura. De esta manera, los componentes mayoritarios identificados para *S. officinalis* son los monoterpenos 1,8-cineol con un 26,6% y α -tujona con un 18,1% (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización química del aceite esencial de *Salvia officinalis*.

| % componente mayoritario | 1,8-cineol | α -tujona | trans- β -cariofileno | α -humuleno |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| <i>Salvia officinalis</i> | 26.6 | 18.1 | 7.3 | 5.4 |
| Clasificación | Monoterpeno heterocíclico | Ketona y monoterpeno | Sesquiterpeno | Sesquiterpeno |

Se realizó el cribado virtual de los componentes mayoritarios del AE: 1,8-cineol y α -tujona mediante los programas Molispiration Chemioinformatics y OSIRIS Property Explorer. Mediante el uso de estos programas, se buscó predecir la toxicología de estas moléculas en términos de mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad reproductiva y efectos adversos sobre hígado, a través de la identificación de grupos de compuestos que comparten componentes estructurales similares.

Se obtuvieron los resultados de los parámetros de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001) o “Regla de los cinco”, en los que se analizan las propiedades físico-químicas que determinan un mejor perfil de adsorción oral, relacionado con su capacidad para atravesar membranas

lipídicas. El nombre de este modelo se debe a que los parámetros de evaluación se enmarcan en múltiplos de 5 y la molécula candidata no puede violar más de una de las siguientes reglas: No más de 5 átomos de nitrógeno y oxígeno donantes de Hidrógenos, no más de 10 átomos de nitrógeno y oxígeno receptores de hidrógenos, peso molecular por debajo de los 500 Daltons y un coeficiente de partición octanol-agua (LogP) menor de 5 (Lipinski *et al.*, 2001; Peniche, 2011).

Los valores de los parámetros de Lipinski obtenidos indican que los dos componentes mayoritarios se encuentran dentro los valores aceptados (menores de 5) para solubilidad en lípidos y en agua; el valor de área de superficie polar topológica (TPSA) es menor a 140 y su peso molecular es menor a 500 Daltons. Por ende, estos compuestos son altamente permeables en membranas biológicas. En relación al perfil de riesgo mutagénico, el 1,8-cineol mostró un nivel de riesgo alto con efectos irritantes, mientras que la α -tujona no presentó ningún nivel de riesgo mutagénico (Tabla 2).

Tabla 2. Cribado virtual de los componentes mayoritarios del AE de *S. officinalis*. Parámetros de Lipinski, CLogP: solubilidad en lípidos; solubilidad en agua; peso molecular; TPSA: Área de Superficie Polar Topológica. Perfiles para riesgo mutagénico: (1) Mutagénico; (2) Tumorogénico; (3) Irritante; (4) Teratogénico.

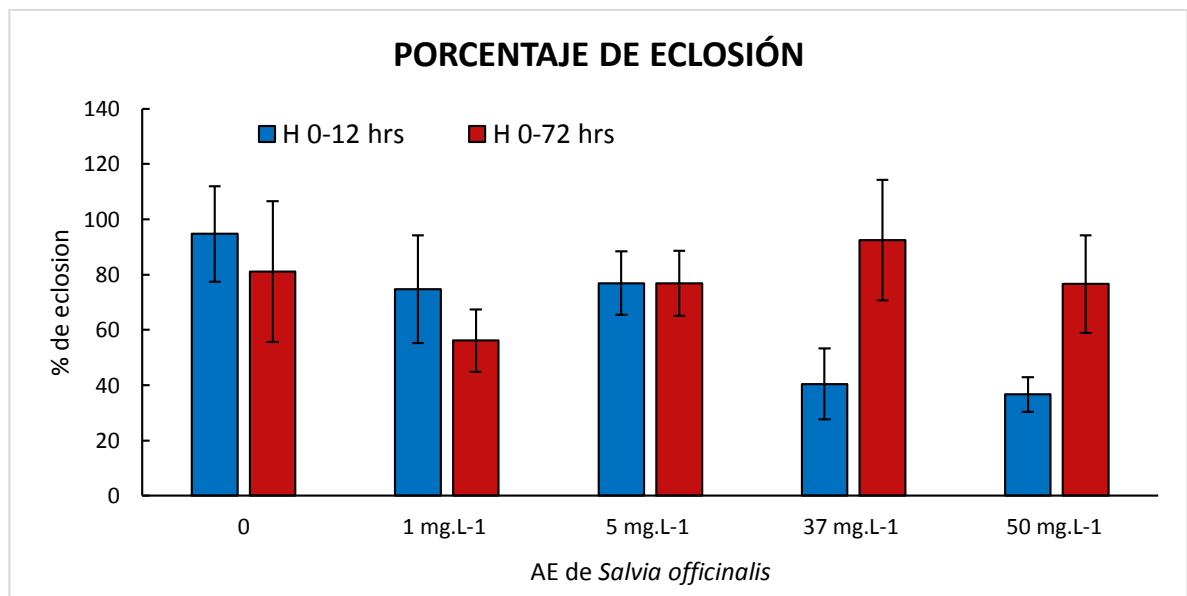
| Componente mayoritario | Parámetros de Lipinski | | | | Perfil de riesgo | | | |
|------------------------|------------------------|-------------|----------------|-------|------------------|---|---|---|
| | cLog P | Solubilidad | Peso molecular | TPSA | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1,8-cineol | 3.15 | 3.24 | 202 | 37.3 | | | | |
| α -tujona | 2.18 | 2.44 | 152 | 17.07 | | | | |

7.2. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

7.2.1. Actividad ovicida. Como resultado del ensayo de ovipostura, se obtuvo un total de 1634 huevos, de los cuales, 580 corresponden a huevos obtenidos en un periodo de 0-12 horas y 1054 corresponden a huevos obtenidos en un periodo de 0-72 horas, los cuales fueron empleados para la ejecución de las ensayos.

Al comparar los porcentajes de eclosión, en los huevos de 0-12 horas se observa una disminución en el porcentaje eclosión a medida que la concentración del AE aumenta, de 77,4% para 1 mg.L⁻¹ a 36,6% para 50 mg.L⁻¹ (Figura 8). En el caso de los huevos de 0-72 horas, se observa un aumento en el porcentaje de eclosión a 37mg.L⁻¹ (92,5%) y 50mg.L⁻¹ (91, 8%) al ser comparado con las otras concentraciones evaluadas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de los huevos de 0-12 horas y el grupo control (Kruskal-Wallis test: p =0,086), ni entre los tratamientos de los huevos de 0-72 horas y el grupo control (Kruskal-Wallis test: p =0,337). Sin embargo, al observar los porcentajes de eclosion obtenidos, parece que el AE es capaz de disminuir el porcentaje de eclosión de huevos con unas pocas horas de exposición, aun a bajas concentraciones (Figura 8).

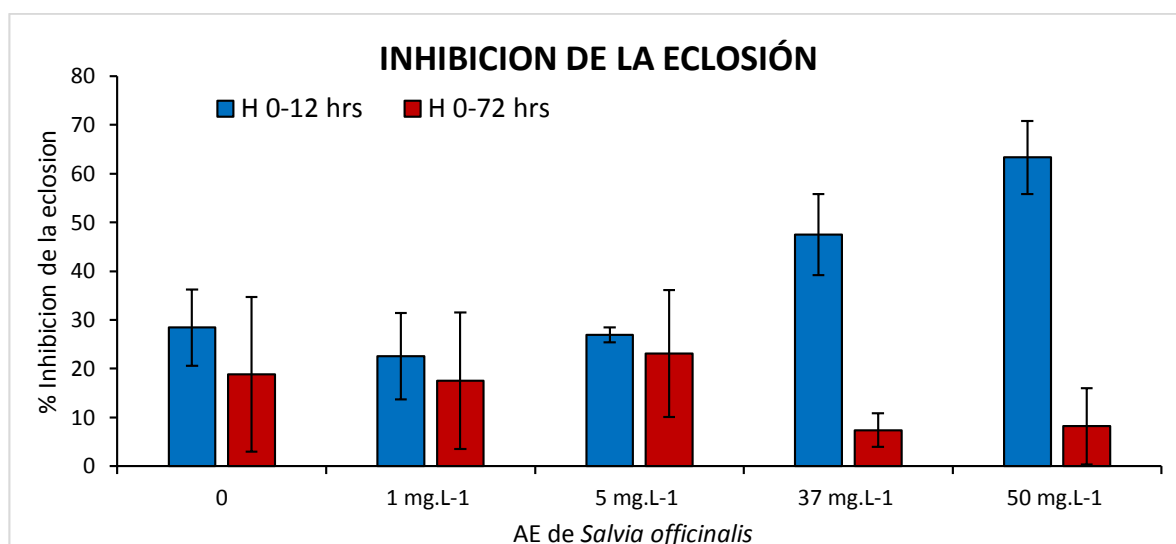
Figura 8. Porcentaje de eclosión de huevos de 0-12 horas y de 0-72 horas, obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,086; huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,337.



Con respecto al porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos, en los huevos 0-12 horas se observó un mayor porcentaje de inhibición a altas concentraciones empleadas, 37 y 50 mg.L⁻¹ (47,4 y 63,3% respectivamente) (Figura 9). Por el contrario, en huevos de 0-72 horas, se observó un mayor porcentaje de inhibición a 1mg.L⁻¹ (46,20%) y 5 mg.L⁻¹ (23%) Los datos no presentaron una distribución normal y no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre los huevos de 0-12 horas y el grupo control (Kruskal-Wallis test: $p = 0,27$), ni entre los tratamientos de los huevos de 0-72 horas y el grupo control (Kruskal-Wallis test: $p = 0,269$). Sin embargo, estos datos pueden estar relacionados con las desviaciones estándar obtenidas, pues los porcentajes de inhibición de la eclosión aumentan con relación a un aumento en la concentración empleada. En este caso, el AE causa un efecto más pronunciado en huevos de 0-12 horas, es decir, con pocas horas de exposición (Figura 9).

Figura 9. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de 0-12 horas y de 0-72 horas (\pm DS), obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: $p = 0,27$; huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: $p = 0,269$.



En relación al desarrollo embrionario en huevos de 0-12 horas, el porcentaje más alto de anomalías se observó a 50mg.L⁻¹ con un 27,5% (Figura 10). Las anomalías observadas consistieron en malformaciones en cabeza donde no se observó la formación de estructuras como ojos y partes bucales, e inexistencia o malformación del tórax. Cabe mencionar que en algunos casos, el embrión se encontraba totalmente deforme, o inexistente. Los datos no presentaron una distribución normal y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de los huevos de 0-12 horas y el grupo control (Kruskal-Wallis test: $p = 0,074$). El coeficiente de Correlación de Spearman mostró una relación positiva ($R = 0,66$), es decir, el porcentaje de

malformaciones en huevos de 0-12 horas tiene una relación directamente proporcional con el aumento en la concentración del AE.

Las malformaciones observadas en la muestra de los huevos de 0-12 horas parecen ser las causantes de los valores de inhibición de la eclosión, debido a que un desarrollo con malformaciones del embrión impide la emergencia de larvas viables (Figura 11).

Figura 10. Porcentaje de huevos 0-12 horas con malformaciones en el embrión, obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,0742. R=0,66.

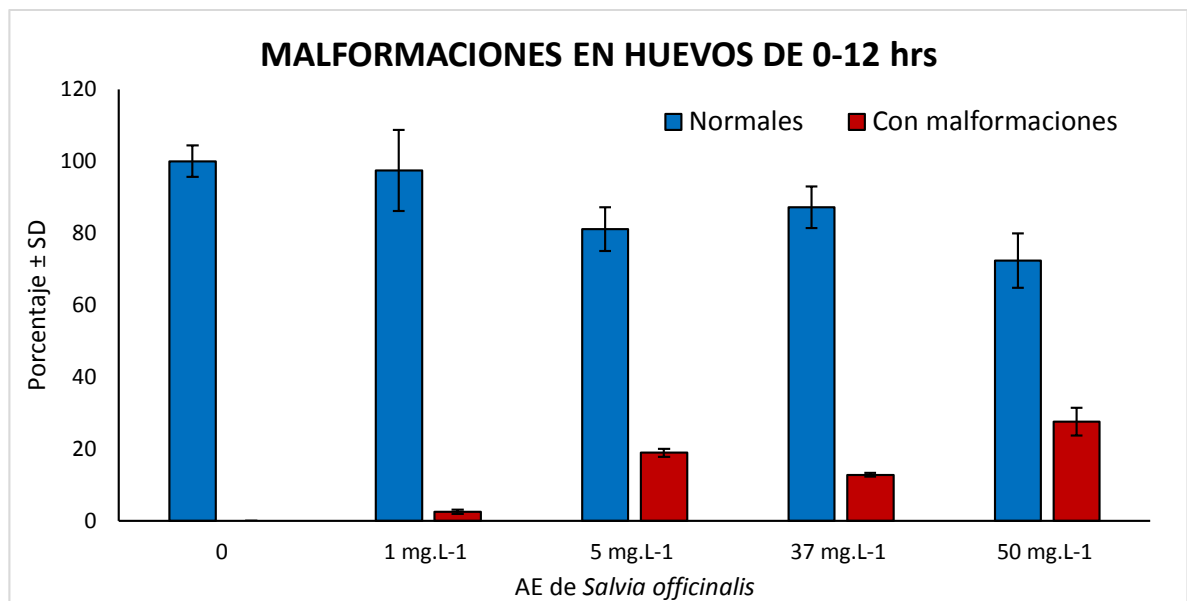
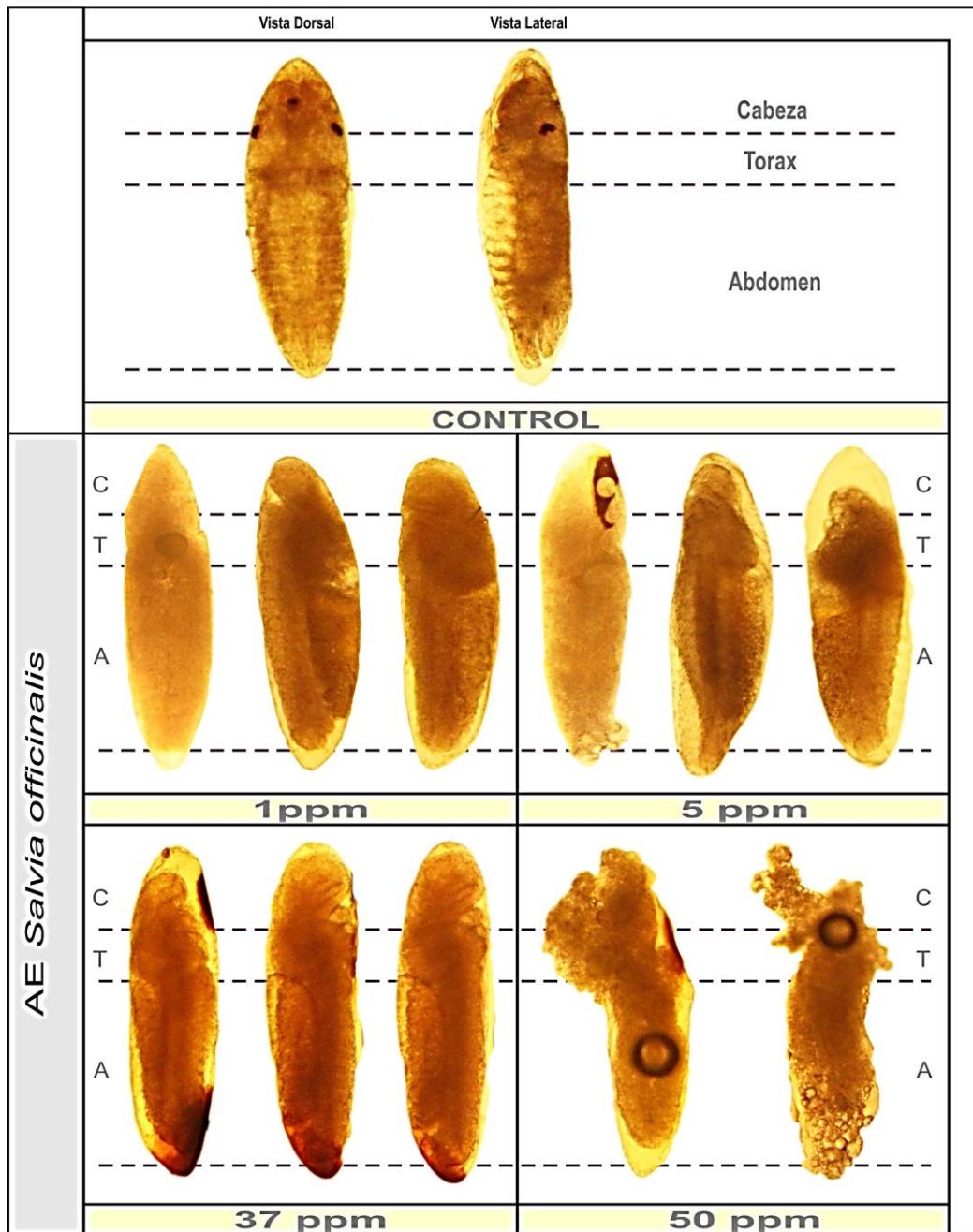


Figura 11. Tipos de malformaciones observadas en el embrión en huevos de 0-12 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1 mg.L⁻¹: embriones mal formados, la capsulas cefálicas indistinguibles; 5 mg.L⁻¹: malformaciones en cabeza, segmentos del abdomen con malformaciones; 37 mg.L⁻¹: cabezas malformadas y fusionadas con el tórax; 50 mg.L⁻¹: corion débil, los embriones no son claramente distinguibles. Huevos sin embrión distinguible, no viables para pasar a fase larval.



En relación a los huevos de 0-72 horas, el porcentaje más alto (26,6%) de malformaciones se presentó en la concentración de 37mg.L⁻¹. Cabe mencionar que en la concentración de 1mg.L⁻¹ el porcentaje de malformaciones en el embrión fue más alto que el observado a 50mg.L⁻¹ (10, 2 % y 3,5% respectivamente). Los datos no presentaron una distribución normal y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de los huevos de 0-72 horas y el grupo control (Kruskal-Wallis test: p=0,3667) El coeficiente de Correlación de Spearman mostró una relación cercana a -1 (R= 0,265), es decir, el porcentaje de malformaciones en huevos de 0-72 horas no tiene una relación directamente proporcional con el aumento en la concentración del AE (Figura 12). Las malformaciones causadas por el aceite estuvieron representadas por malformaciones en cabeza (inexistencia de partes bucales, gran tamaño), tórax (formación anormal) y abdomen (escasamente diferenciado, no completo y con malformaciones al final de los últimos segmentos). Aunque el tipo de daño causado no difiere del observado para huevos frescos, un mayor tiempo de exposición a concentraciones más bajas del AE, puede llegar a inducir el mismo tipo de daño observado a altas concentraciones, pero con un tiempo de exposición menor (Figura 13).

Figura 12. Porcentaje de huevos 0-72 horas con malformaciones en el embrión, obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,3667. R= 0,265.

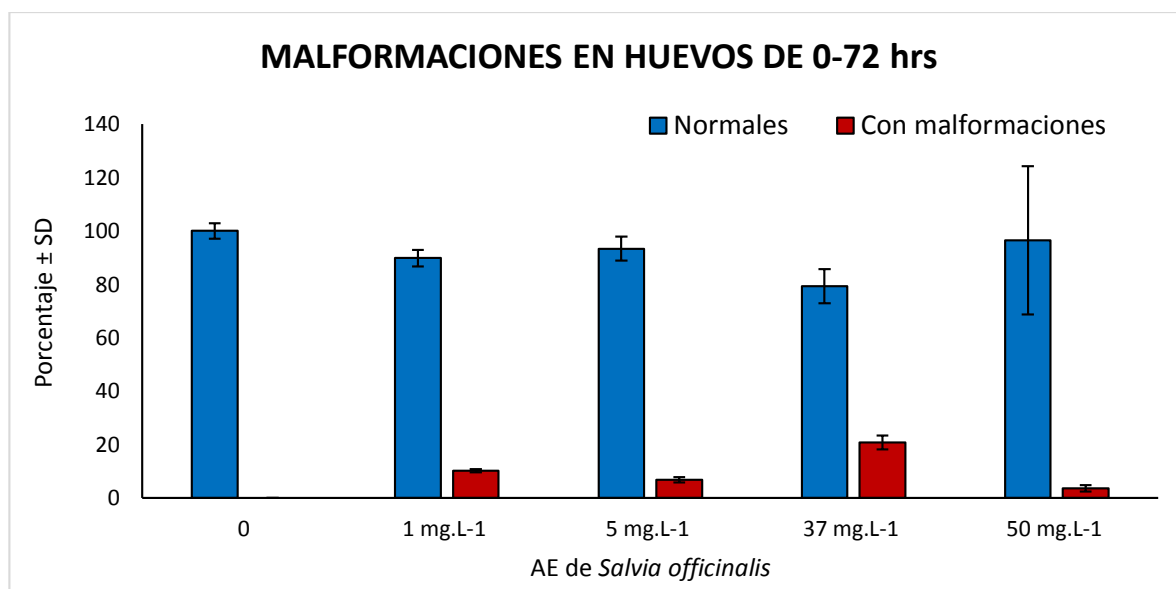
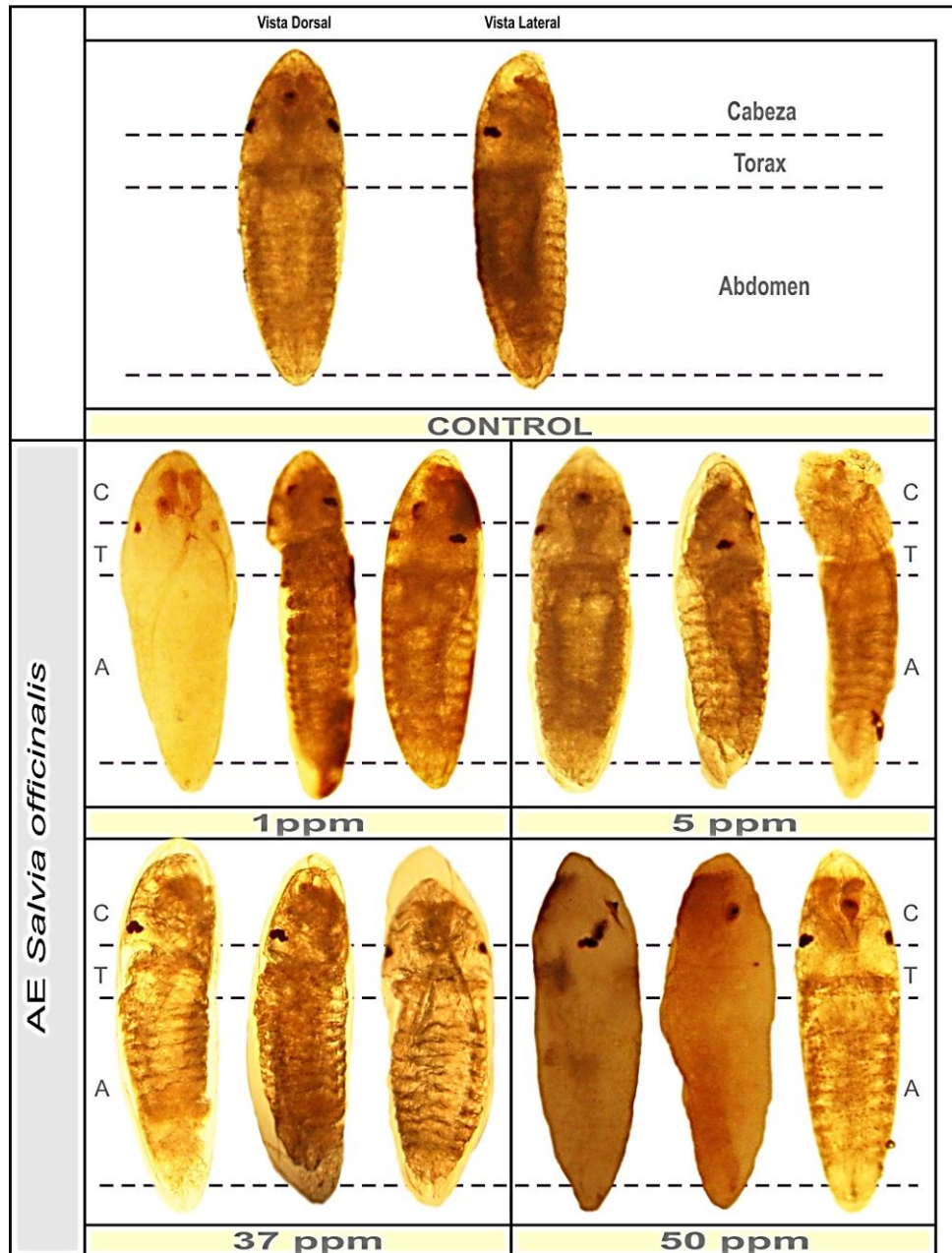


Figura 13. Tipos de malformaciones observadas en el embrión en huevos de 0-72 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1mg.L⁻¹: malformaciones en cabeza, aumento anormal del tamaño del huevo, tórax y abdomen con malformaciones; 5 mg.L⁻¹: malformaciones en cabeza, o capsula cefálica no distinguible, tórax de tamaño pequeño; 37 mg.L⁻¹: embriones con tórax escasamente distinguible, cabeza de gran tamaño y segmentos abdominales con malformaciones; 50 mg.L⁻¹: secciones del embrión indistinguibles, malformaciones en cabeza y en segmentos abdominales.



Al observar la eclosión anormal de los huevos, los valores obtenidos fueron mas altos en los huevos de 0-12 horas, siendo el porcentaje mas alto 43,3% a 50 mg.L⁻¹. Los datos no presentaron una distribución normal y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control (Kruskal-Wallis test: p =0,030). En cuanto a los huevos de 0-72 horas, se obtuvo un mayor porcentaje de eclosión anormal a 37 mg.L⁻¹ con 6,6% y no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones y el control (Kruskal-Wallis test: p =0,6517) (Figura 14). Posiblemente el AE pueda afectar el endurecimiento de la parte mas externa del huevo, el corion, el cual brinda protección al embrión frente a factores externos. El daño ocasionado en el corion se ve reflejado en morfologías de eclosión anormal, con cubiertas totalmente abiertas, o con larvas que quedan atrapadas en el borde de la cubierta del huevo (Figura 15 y Figura 16).

Figura 14. Porcentaje de huevos con eclosión anormal obtenidos de 0-12 horas y 0-72 horas, en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). * Diferencias estadísticas significativas con relación al control en huevos 0-12 horas (Kruskal-Wallis test: p =0,030). No se encontraron diferencias estadísticas significativas para huevos 0-72 horas (Kruskal-Wallis test: p =0,6517).

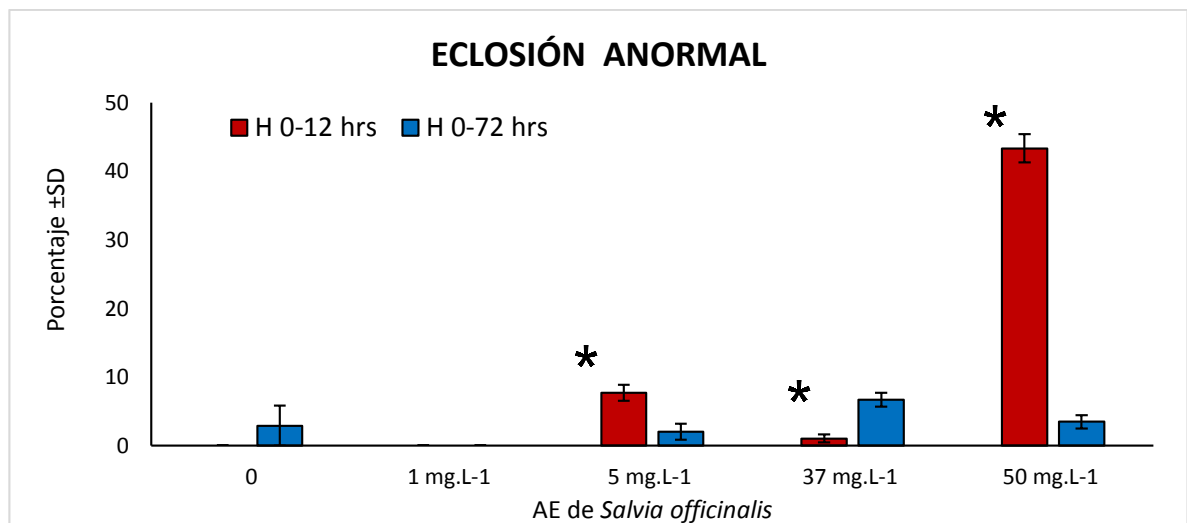


Figura 15. Huevos con eclosión anormal observados en el tratamiento 0-12 horas y obtenidos de la prueba de ovoposición con el AE de *Salvia officinalis*. **a.** Eclosión normal (Control). **b.** Emergencia anormal de una larva L1, la cual murió después de unas horas. **c.** Eclosión anormal, el corion se encuentra totalmente abierto.

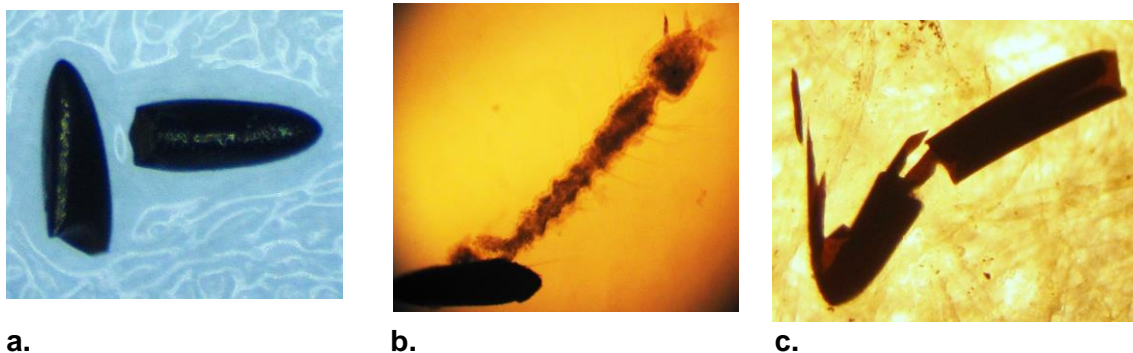


Figura 16. Huevos con eclosión anormal observados en el tratamiento 0-72 horas, y obtenidos de la prueba de ovoposición con el AE de *Salvia officinalis*. **a.** Eclosión normal (Control). **b.** Emergencia anormal del embrión, por un costado del huevo. **c.** Eclosión anormal, el corion se encuentra totalmente abierto.



En relación a las larvas obtenidas de los huevos en cada uno de los tratamientos y concentraciones evaluadas, se observó un mayor porcentaje de anomalías a 37 y 50 mg.L⁻¹ para huevos de 0-12 horas y huevos de 0-72 horas, respectivamente. Los datos no presentan una distribución normal y no se encontraron diferencias estadísticas significativas en huevos de 0-12 horas (Kruskal-Wallis test: $p= 0,1710$) ni en huevos de 0-72 horas (Kruskal-Wallis test: $p= 0,3492$) al ser comparados con el control (Figura 17). En cuanto a las anomalías observadas, se encuentran daños morfológicos representados principalmente en la disminución de la cantidad de quitina en la cabeza de

las larvas, movimientos lentos o anormales, malformaciones en la unión cabeza-tórax, y en algunos casos muerte (Figura 18, Figura 19). El ingreso de los componentes del AE durante el desarrollo del embrión a través del corion, influye directamente en el posterior desarrollo y viabilidad de las larvas emergidas, y aunque no se ve comprometido su paso a la fase adulta posiblemente por no afectarlas hormonalmente, los daños morfológicos causados podrían incidir en otros procesos fisiológicos como adquisición de nutrientes, defensa contra agentes externos y un gasto energético más elevado que el de una larva normal.

Figura 17. Porcentaje de larvas anormales observadas de huevos 0-12 horas y huevos 0-72 horas obtenidos en diferentes concentraciones del AE de *Salvia officinalis* (1, 5, 37 y 50 mg.L⁻¹). Huevos 0-12 horas Kruskal-Wallis test: p =0,1710; huevos 0-72 horas Kruskal-Wallis test: p =0,3492.

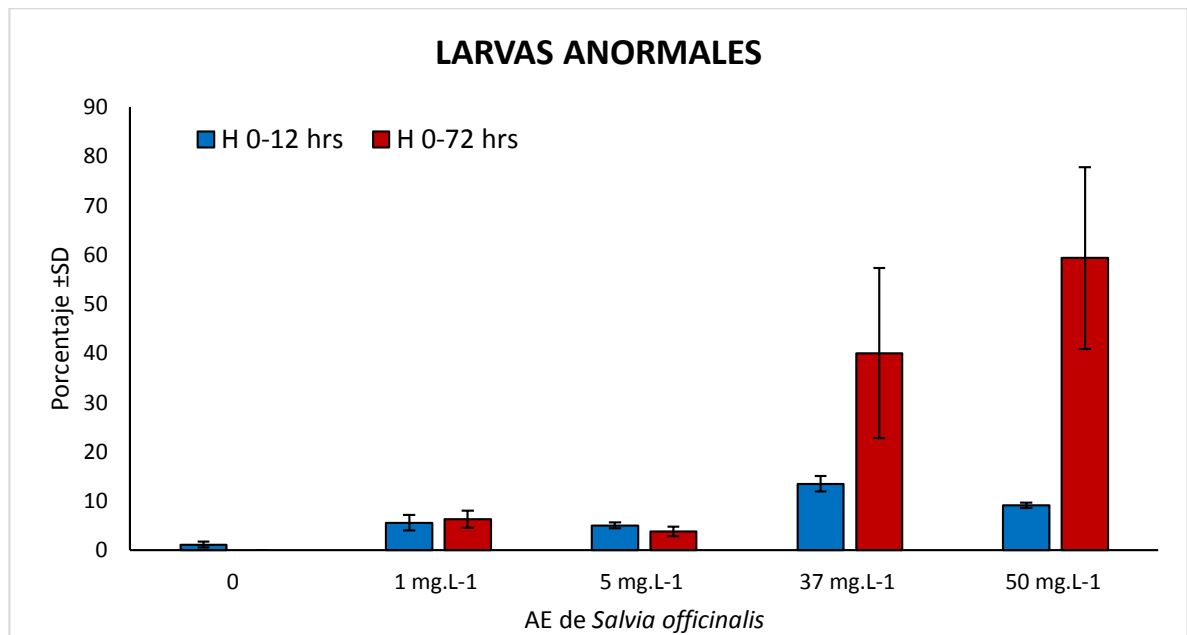
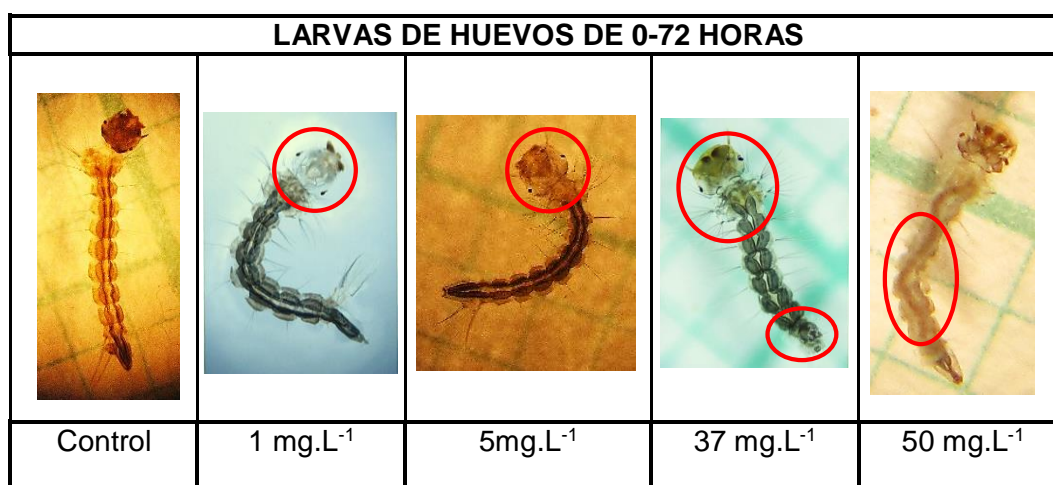


Figura 18. Tipos de malformaciones larvarias observadas en huevos de 0-12 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1 mg.L⁻¹: cabeza más grande que el tórax, movimientos lentos; 5 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica (Imagen izquierda), anomalías en las branquias anales (Imagen derecha); 37 mg.L⁻¹: tórax más estrecho de lo normal, comportamiento lento frente a estímulos externos; 50 mg.L⁻¹: cabeza pegada al tórax (inferior derecha) en comparación con una larva normal (Superior izquierda).



Figura 19. Tipos de malformaciones larvarias observadas en huevos de 0-72 horas, obtenidas y discriminadas por cada una de las concentraciones del AE de *Salvia officinalis*. 1 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica; 5 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica; 37 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica, tórax y abdomen más cortos y pequeños de lo normal; 50 mg.L⁻¹: escaza quitinización cefálica, anomalías en el tracto digestivo, abdomen con malformaciones.



7.2.2. Actividad larvicida. El porcentaje más alto de actividad larvicida se observó a una concentración de 76 mg.L⁻¹ (36,7%) a las 24 horas de exposición, seguido de una concentración de 63 mg.L⁻¹ con una mortalidad de 26,7%. A las 48 horas la mortalidad fue de 37,5% a 76 mg.L⁻¹ y de 34,2% a 63 mg.L⁻¹. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados a las 24 (Kruskal-Wallis test: p= 0,1523) y 48 horas (Kruskal-Wallis test: p =0,1579) (Tabla 3).

Al realizar el cálculo de las concentraciones letales 50 y 95 del aceite esencial de *S. officinalis* para actividad larvicida, se observó que las CL₅₀ tanto para 24 como para 48 horas se encuentran por debajo de 80mg.L⁻¹, mientras que para CL₉₅ los valores obtenidos corresponden a casi el doble, con un valores de 123 mg.L⁻¹ a las 24 horas y de 198mg.L⁻¹ a las 48 horas (Tabla 4).

Tabla 3. Actividad larvicida del aceite esencial de *S. officinalis*. 24 horas: Kruskal-Wallis test: H (5, N= 18) F = 8,072327 p =0,1523; 48 horas Kruskal-Wallis test: H (5, N= 18) F =7,970630 p =0,1579.

| Aceite esencial | Concentración (mg.L ⁻¹) | Mortalidad (%±SD) | |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------|
| | | 24±SD | 48±SD |
| | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 3.3±2.3 | 5±1.7 |
| | 47 | 5.6±3.3 | 15.6±6.8 |
| <i>Salvia officinalis</i> | 51 | 3.8±3 | 8±4.6 |
| | 63 | 26.7±13.4 | 34.2±14.8 |
| | 76 | 36.7±18.6 | 37.5±19.2 |

Tabla 4. Concentraciones letales 50 y 95 de actividad larvícida del aceite esencial de *S. officinalis*.

| 24 horas | | | 48 horas | | |
|---------------------|------------------------|----------------|---------------------|-----------------------|----------------|
| LC ₅₀ | LC ₉₅ | X ² | LC ₅₀ | LC ₉₅ | X ² |
| 76.43 (71.84-83.79) | 123.92 (106.98-136.75) | 5.46 | 77.53 (69.71-91.14) | 198.20 (149.17-322.5) | 1.37 |

7.2.3. Actividad pupícida. La mayor acción pupícida se evidenció en la concentración de 390 mg.L⁻¹, tanto a las 24, como a las 48 horas de exposición (68.9±3.1 y 100). A las 48 horas de exposición, los porcentajes de mortalidad fueron superiores al 50%, aun en las concentraciones más bajas (250 y 310 mg.L⁻¹). Al promediar los porcentajes de mortalidad, el valor más alto se presentó a las 48 horas de exposición. Los datos no presentan una distribución normal, a las 24 horas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) F=7,533333 p =0,0567), pero si se observaron diferencias significativas a las 48 horas entre los tratamientos y el control (Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) F=8,569604 p =0,0356) (Tabla 5). Al comparar los valores de mortalidad pupícida con los de actividad larvícida, los porcentajes obtenidos para pupas son más altos, indicando que posiblemente los componentes del AE tengan un modo de ingreso también por contacto, pues durante esta fase de desarrollo el individuo no se alimenta.

Tabla 5. Actividad pupícida del aceite esencial de *S. officinalis*. 24 horas: Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) F=7,533333 p =0,0567. *Diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas (Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) F=8,569604 p =0,0356)

| Aceite esencial | Concentración (mg.L ⁻¹) | Mortalidad (%±SD) | |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------|
| | | 24±SD | 48±SD |
| | 0 | 0 | 0* |
| <i>Salvia officinalis</i> | 250 | 15.6±1.5 | 73.3±3.5* |
| | 310 | 44.4±5.8 | 88.9±1.5* |
| | 390 | 68.9±3.1 | 100* |

7.2.4. Actividad adulticida. Para todos los tiempos de registro de datos (0, 60, 120 minutos y 24 horas), la concentración con mayor porcentaje de mortalidad fue de 1000 mg.L⁻¹. De los 0 a los 2 minutos de exposición no se observó ningún efecto sobre los individuos expuestos, la mortalidad observada a una concentración de 30 mg.L⁻¹ fue superior a la obtenida con 300 mg.L⁻¹. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el Control (acetona) y las concentraciones en el tiempo de exposición de 0-2 minutos ($p=1,0$), pero si se encontraron diferencias significativas entre el control y las concentraciones a los 60 min ($p=0,022$), a los 120 min ($p=0,028$) y a las 24 horas ($p=0,0084$). Las diferencias estadísticas observadas en los diferentes tiempos de exposición, evidencian que el modo de acción del AE en individuos adultos es de acción rápida y prolongada, sin recuperación de los efectos causados (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad adulticida del aceite esencial de *S. officinalis*. Letras iguales indican diferencias estadísticas significativas con respecto al control. a. 60 minutos $p=0,022$; b. 120 minutos $p=0,028$; c. 24 horas $p=0,0084$.

| Aceite Esencial | Concentración (mg.L ⁻¹) | Mortalidad (%±SD) | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| | | 0-2 min | 60 min | 120 min | 24 horas |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 55±3 ^a | 62±2 ^b | 100 ^c |
| <i>Salvia officinalis</i> | 300 | 0 | 40±2.4 ^a | 50±3 ^b | 100 ^c |
| | 1000 | 0 | 65±2.6 ^a | 70±2.2 ^b | 100 ^c |

7.2.5. Actividad de repelencia a la picada de los mosquitos. El mayor porcentaje de repelencia se observó en el intervalo de tiempo de 2 a 15 minutos (48%), con un porcentaje de picadura de 20%. Se registró un mayor número de picadas en el tratamiento control durante el intervalo de tiempo de 2 a 15 minutos (13). Los datos presentan una distribución normal y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al aplicar el ANOVA ($p\geq 0,05$) (Tabla 7). Los componentes volátiles del AE

causan un efecto repelente de corta acción en el tiempo, sin embargo, mediante una formulación adecuada, podría incrementarse el tiempo de protección y ser empleado como repelente comercial contra picadas de mosquitos.

Tabla 7. Actividad repelente del aceite esencial de *S. officinalis* evaluado de 0 a 2 minutos y de 0 a 15 minutos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control.

| Aceite esencial | %Repelencia Brazo(%±DS) | Control ±SD | % picadura |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|-------------------|
| 2 minutos | | | |
| | 25±1 | 6±2 | 3.3 |
| <i>Salvia officinalis</i> | 15 minutos | | |
| | 48±3,6 | 13±1,5 | 20 |

7.2.6. Actividad deterrente. En relación a la disuasión de la ovoposición (ER), las tres concentraciones evaluadas (5, 50 y 200 mg.L⁻¹) de *S. officinalis* presentaron porcentajes de inhibición sobre el 80%. La concentración de 200mg.L⁻¹ presentó el valor más alto de inhibición de la ovoposición, relacionado directamente con el valor obtenido en el Índice de actividad de la ovoposición (-0,94), lo cual indica que las hembras de *S. aegypti* evitan poner sus huevos en todas las concentraciones evaluadas, especialmente en la más alta (Tabla 8). Los datos no presentaron una distribución normal y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de inhibición en las concentraciones evaluadas y el tratamiento control (sin AE) (p=0,015).

Tabla 8. Actividad de inhibición de la ovoposición del aceite esencial de *S. officinalis*. OAI: Índice de actividad de la ovoposición (Valores negativos indican una mayor cantidad de huevos en los controles; valores positivos indican una mayor cantidad de huevos en los tratamientos), IE: Efecto de inhibición. *Significativamente diferente del control ($p=0,015$).

| Aceite esencial | Concentración mg.L⁻¹ | IE% (%±DS) | OAI |
|---------------------------|--|-----------------------|------------|
| | 0 | 0±103,2 | 0 |
| <i>Salvia officinalis</i> | 5 mg.L-1 | 92,1±12,7* | -0,853 |
| | 50 mg.L-1 | 90,8±13* | -0,831 |
| | 200 mg.L-1 | 97±4.8* | -0,941 |

7.3. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

7.3.1. Determinación de la presencia/ausencia de degradación de ADN total de *Stegomyia aegypti*. En la electroforesis de ADN de larvas tratadas por 24 horas con concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀ se observaron bandas con pesos moleculares de 10.000 y 8.000 pb (ADN de larva sin tratamiento). Por el contrario, el tratamiento del ADN tratado con Camptotecina (CPT) (Alcaloide citotóxico que inhibe la enzima topoisomerasa I, causando la degradación del ADN) se observa la degradación del ADN total en larvas tratadas por 24 horas al no encontrarse ningún rastro de ADN en el gel de agarosa. La CPT también mostró un patrón de degradación al ser adicionado directamente al ADN justo antes de la siembra en el gel (Directo). La CPT adicionada antes de la extracción de ADN, durante homogenización de las larvas (Homo), no evidencio ningún cambio al ser comparado con el Control + (Figura 20).

En la electroforesis de ADN al cual se le adicionó aceite esencial de *S. officinalis* durante la homogenización de las larvas, se obtuvo una fuerte degradación en todas las concentraciones evaluadas (CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀) pues no se observó ningún patrón de

bandas a lo largo del gel de agarosa. Los tratamientos con CPT mostraron un leve patrón de degradación cuando fue adicionado al Homogenato, y una banda completa de tamaño mayor a las 10.000 pb, no muy diferente al observado con el ADN total (Control + de la extracción) cuando el AE se adiciono directamente el ADN (Figura 21). Teniendo en cuenta que no ocurrió la degradación del ADN de larvas previamente expuestas al aceite, es posible que la degradación del ADN en el homogenato se deba a la acción del AE sobre otros componentes celulares que inducen la degradación total del ADN.

La acción del aceite esencial de *Salvia officinalis* adicionado directamente en el ADN antes de ser sembrado en el pozo, mostro un leve patrón de degradación. Sin embargo, al ser comparados con el ADN total (Control +), el tamaño de banda en todas las concentraciones evaluadas (CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀), incluso para el tratamiento con CPT permanece entre la región de las 8.000 y 10.000 pb. Este resultado muestra que el AE no causa ningún tipo de daño directamente en el ADN (Figura 22).

Figura 20. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Larvas sometidas a concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀ del aceite esencial de *Salvia officinalis*, por 24 hrs. Control (-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Campotepcina a 4 µM. CPT 24 hrs: ADN de larvas previamente tratadas; CPT Homo: El CPT adicionado en el homogenato de larvas previo a la extracción de ADN; CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN.

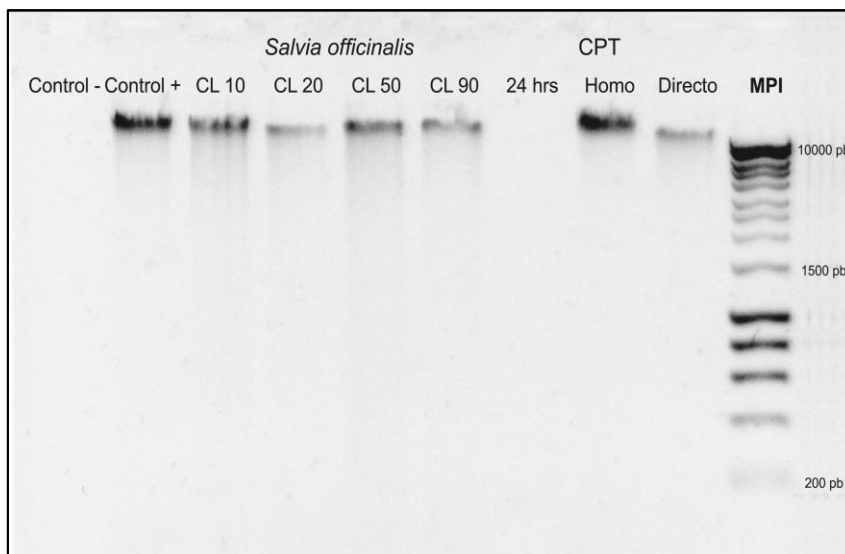


Figura 21. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Acción del aceite esencial de *Salvia officinalis* adicionado durante la homogenización de las larvas (L3-L4) a concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀. Control(-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Campotepecina a 4 μM. CPT Homo: El CPT adicionado en el homogenato de larvas previo a la extracción de ADN; CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN.

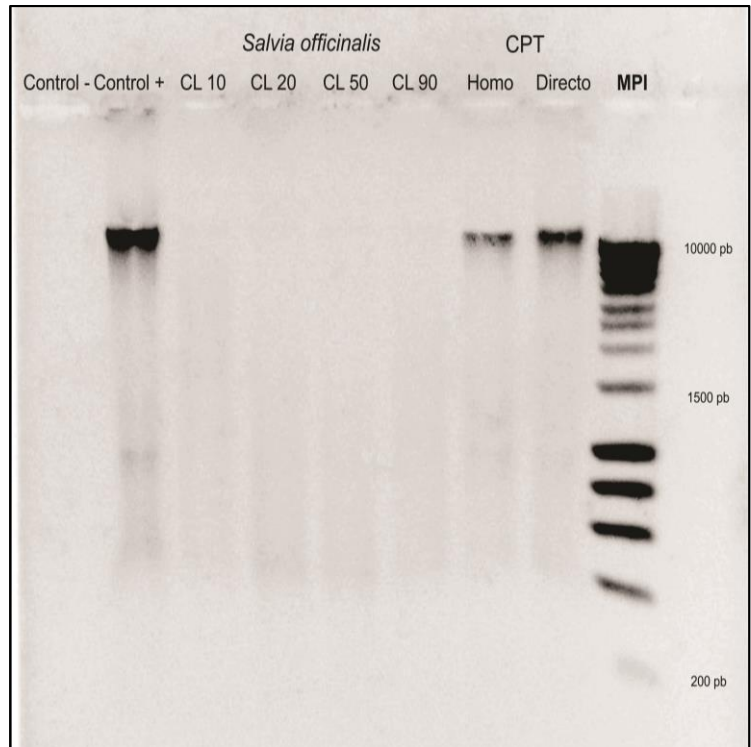
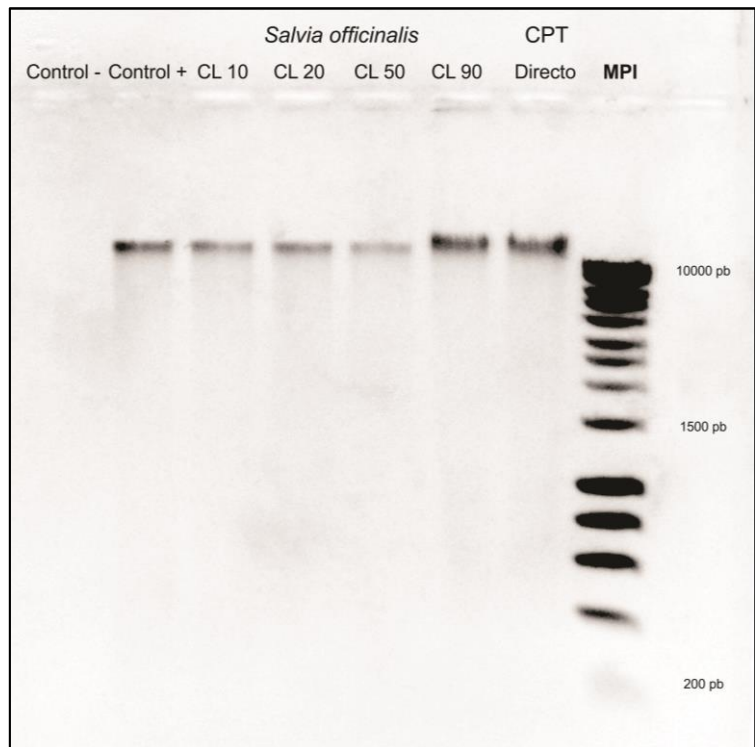
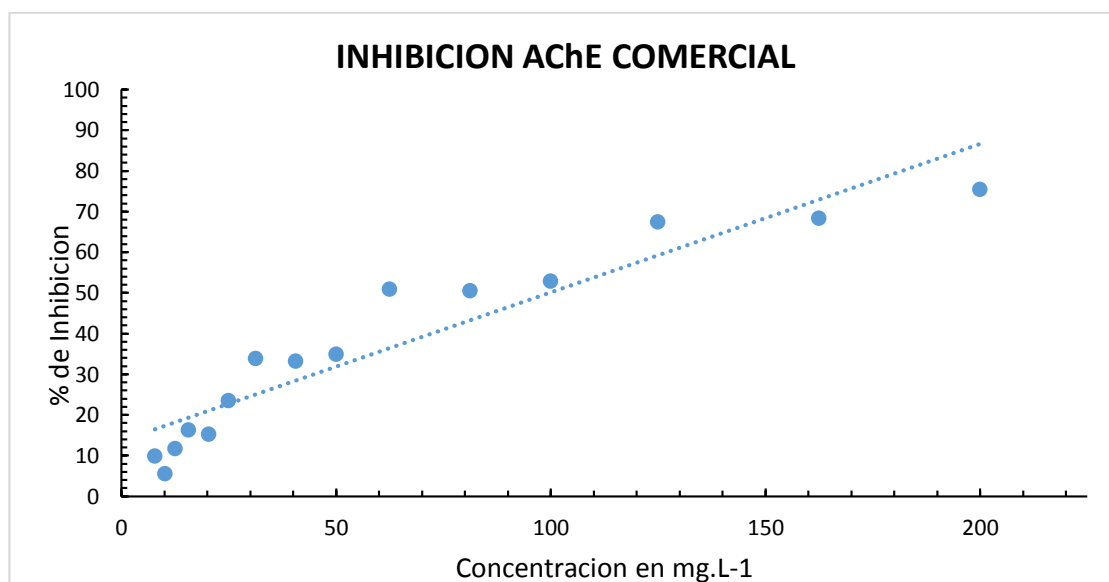


Figura 22. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Acción del aceite esencial de *Salvia officinalis* adicionado directamente en el ADN antes de ser sembrado en el pozo, a concentraciones de CL₁₀, CL₂₀, CL₅₀ y CL₉₀. Control (-): ADN sin Marcador de Peso Molecular. Control de la extracción (+): ADN + Marcador de Peso Molecular. Campotepecina a 4 μM. CPT Directo: CPT adicionado directamente en el ADN.



7.3.2. Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa. Al evaluar la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, los porcentajes se encuentran entre el 30 y el 35 % en las réplicas realizadas, con una IC 50 promedio de 78 mg.L⁻¹ (Figura 23). En general los valores de inhibición son superiores al 75%, indicando que el AE tiene un efecto directo en la transmisión de los impulsos nerviosos. El análisis de correlación mostró un valor cercano a 1 (R=0,94), indicando una relación directamente proporcional entre el porcentaje de inhibición y la concentración del AE.

Figura 23. Porcentajes de inhibición de la enzima acetil-ticolina con el aceite esencial de *Salvia officinalis*. Control positivo con Propoxur IC₅₀=0,015. Análisis de Correlación R= 0,94.



7.3.3. Ensayo de evaluación del mecanismo de acción mitocondrial. Con el fin de conocer si el AE de *S. officinalis* causa algún efecto en el flujo respiratorio y la fosforilación oxidativa de la mitocondria en mosquitos, se llevaron a cabo diferentes experimentos que cuantifican la velocidad de consumo de oxígeno a una concentración CL₁₀=45 mg.L⁻¹; CL₂₀=55 mg.L⁻¹ y CL₅₀= 80 mg.L⁻¹. Se realizó un control para cada concentración y sustrato evaluado, en el caso de la CL₁₀ el 100% de actividad corresponde a 6,53±1,95 nmol de O₂ consumido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para glutamato y 3,99±1,63 nmol de O₂ consumido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para succinato. Para CL₂₀, el 100% de actividad corresponde a 3,203±0,85 y 4,45±1,83 nmol de O₂

consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para glutamato y succinato respectivamente. Y por último, CL_{50} con $4,52 \pm 1,62$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para Glutamato y $3,70 \pm 0,78$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para succinato.

Se observó una leve disminución en el consumo de oxígeno para los dos sustratos en presencia de ADP (Estado 3). En las CL_{10} y CL_{50} evaluadas se observó una disminución marcada, aun cuando no se encontraron diferencias estadísticas significativas al realizar el ANOVA entre los controles y las concentraciones evaluadas en cada sustrato, glutamato ($p=0,081$) y succinato ($p=0,29$). Por otro lado, con la CL_{20} se observó un leve aumento en el consumo de oxígeno al ser comparado con las otras dos concentraciones evaluadas. Al realizar la comparación entre sustratos para cada una de las concentraciones evaluadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas indicando que los porcentajes de consumo de oxígeno en el estado 3 no son diferentes al usar glutamato o succinato, sustratos que suministran electrones vía complejo I y II de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 24).

En relación al consumo de oxígeno en ausencia de ADP (Estado 4), para CL_{10} el 100% de actividad corresponde a $1,33 \pm 1,22$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína para glutamato y $0,99 \pm 0,93$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína para succinato. Para CL_{20} , el 100% de actividad corresponde a $0,66 \pm 0,27$ y $1,54 \pm 0,49$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para glutamato y succinato respectivamente. Y CL_{50} con $1,23 \pm 1,20$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para glutamato y $1,16 \pm 1,03$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para succinato.

En los resultados obtenidos se observa que la adición del AE causa un leve aumento dosis-dependiente en el Estado 4 para el sustrato glutamato, mientras que para el sustrato succinato, se observó un aumento de casi el 50% con CL_{10} , con una subsiguiente disminución con la CL_{20} y un leve aumento con la CL_{50} (Figura 25). La ANOVA (Kruskal-Wallis) no arrojó diferencias estadísticas significativas entre los controles y el sustrato glutamato ($p=0,10$), ni el sustrato succinato ($p=0,49$) debido a los valores de desviación estándar obtenidos en cada caso. Al realizar la comparación entre sustratos para cada una de las concentraciones evaluadas, no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas ($CL_{10}= 0,25$; $CL_{20}=0,39$; $CL_{50}=0,25$) indicando que los porcentajes de consumo de oxígeno en el estado 4 no son diferentes para cada uno de los sustratos. Cabe señalar que en el Estado 4 se obtuvieron valores pequeños de consumo de oxígeno en el control, así que pequeñas variaciones en los datos obtenidos con el AE aumentan mucho la dispersión de los datos (Figura 25).

Figura 24. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (Estado 3) con glutamato y succinato. Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar. ADP a 0,6mM; glutamato a 5mM; succinato a 3mM; fosfato inorgánico a 1,6mM; mitocondria a 1mg.mL.

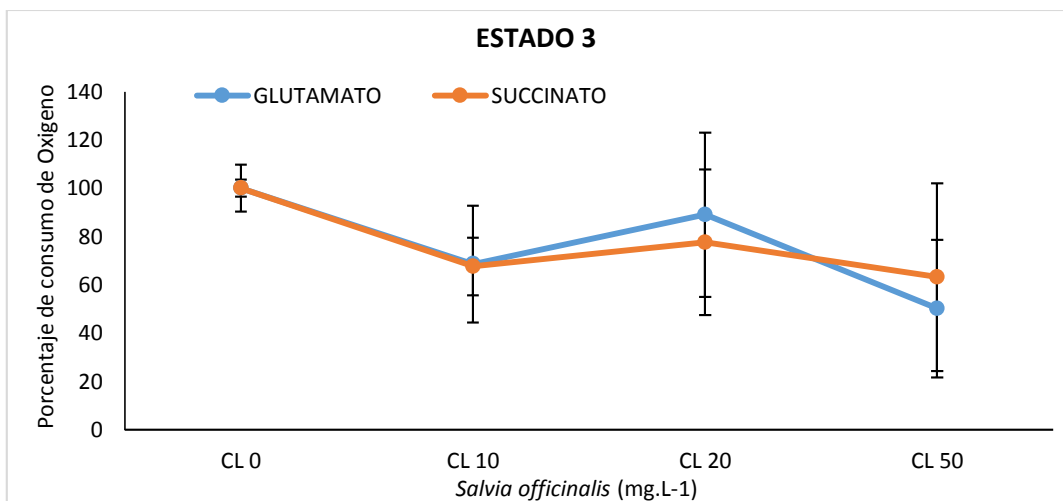
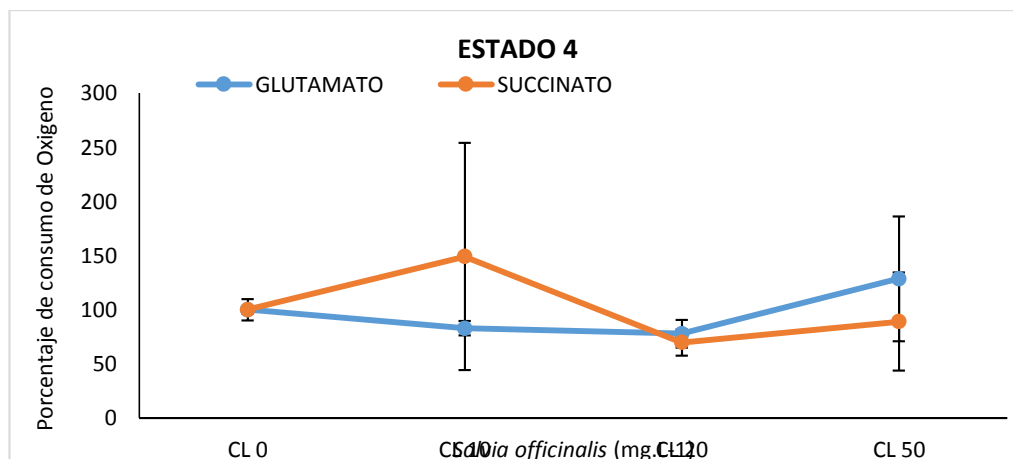
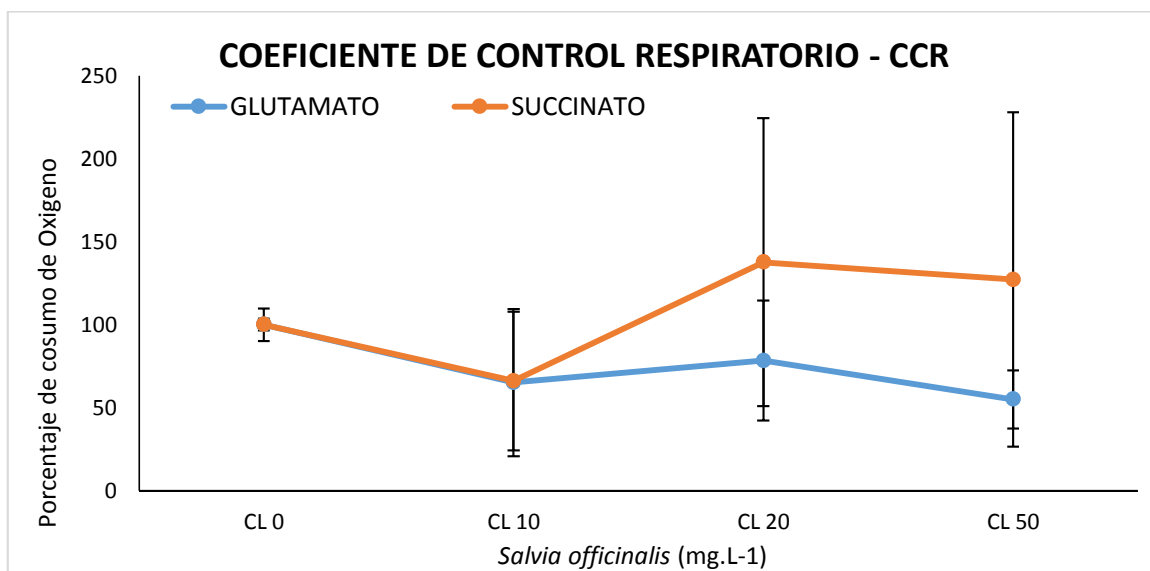


Figura 25. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (Estado 4) con glutamato y succinato (3mM). Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar. ADP a 0,6mM; glutamato a 5mM; succinato a 3mM; fosfato inorgánico a 1,6mM; mitocondria a 1mg/mL.



Al evaluar el Coeficiente de control respiratorio, se observa una disminución promedio del 29,3 % con el sustrato glutamato (Complejo I), y un aumento en los valores obtenidos de entre el 30 y el 40% para el sustrato succinato (Complejo II) al adicionar el AE a las concentraciones CL₂₀ y CL₅₀. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones evaluadas para el glutamato ($p=0,38$) y el succinato ($p=0,53$). Al realizar la comparación entre sustratos para cada una de las concentraciones evaluadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (CL₁₀ = 0,97; CL₂₀=0,25; CL₅₀=0,20) indicando que los porcentajes de consumo de oxígeno en el Coeficiente de Control Respiratorio no son diferentes, por ende el comportamiento de los Complejos I y II no difiere en cada una de las concentraciones del AE (Figura 26).

Figura 26. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR) con glutamato y succinato. Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar. ADP a 0,6mM; glutamato a 5mM; succinato a 3mM; fosfato inorgánico a 1,6mM; mitocondria a 1mg/mL.



En el CCR, el 100% de actividad para CL₁₀ corresponde a 7,72 \pm 5,17 para glutamato y 6,16 \pm 3,87 para succinato. Para CL₂₀, el 100% de actividad corresponde a 5,89 \pm 3,86 y 3,27 \pm 2,26 para glutamato y succinato respectivamente. Y CL₅₀ con 5,77 \pm 4,34 para Glutamato y 5,77 \pm 5,80 para succinato.

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes sustratos comparados con el control, tanto en el Estado 3, Estado 4 y CCR, si se encontraron alteraciones en el consumo de O₂, razón por la cual se decidió evaluar las diferentes enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

- Actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial

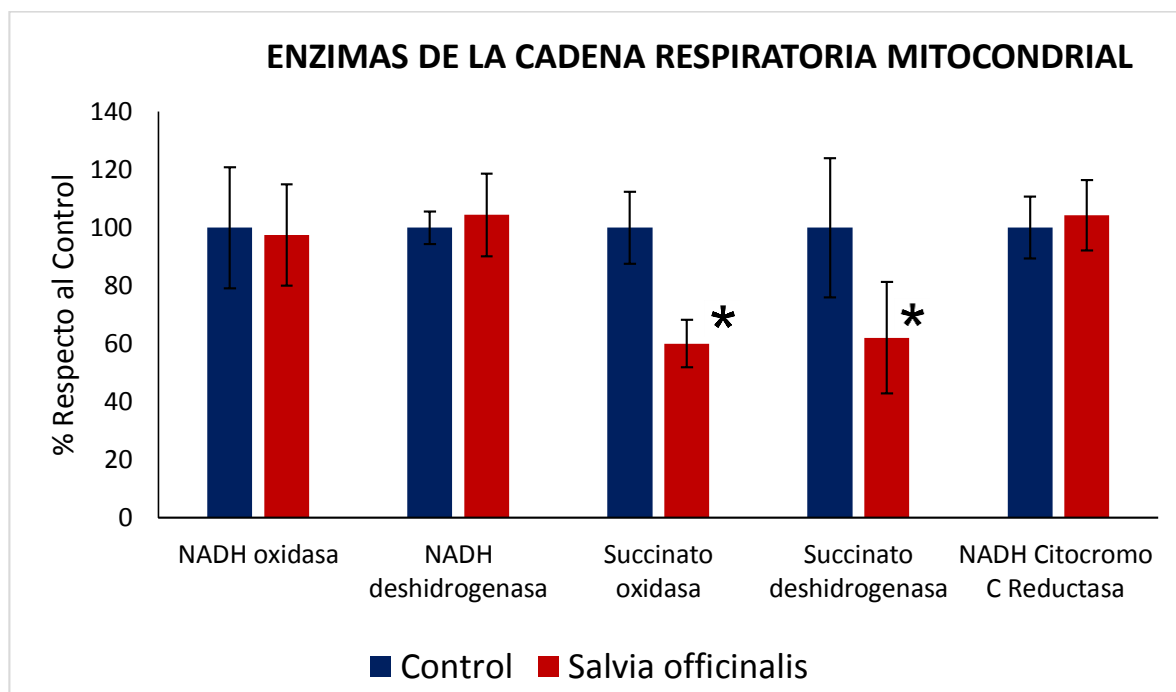
El efecto del AE sobre la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue evaluado a una única concentración CL₅₀, correspondiente a 80mg.L⁻¹. Para estudiar los efectos del AE sobre el Complejo I de la cadena respiratoria, se evaluó la actividad sobre las enzimas NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa. El AE no indujo alteraciones sobre la actividad de ninguna de las dos enzimas, indicando que no inhibe el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para ninguna de estas enzimas (NADH oxidasa p=0,87; NADH deshidrogenasa p=0,62). En estas enzimas el 100% correspondiente a 0,017±0,0073 μmol.mg de ferrocianuro reducido min⁻¹.mg⁻¹ de proteína para la NADH deshidrogenasa y 47,8 ±9,90 μmol.mg de O₂ consumido/min .mg de proteína para NADH oxidasa (Figura 27).

También se evaluó la enzima NADH citocromo c reductasa, enzima correspondiente al Complejo 3 de la cadena respiratoria mitocondrial, suministrando electrones vía Complejo I. Nuevamente no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de esta enzima (p=0,53), con un 100% de actividad correspondiente a 1,70±0,244 μmol citocromo C reducido por min.mg proteína (Figura 27).

Para las enzimas succinato deshidrogenasa y succinato oxidasa, se observó una disminución con respecto al control, donde 100% correspondiente a 1,64±1,24 μmol de DCPIP reducido por min/mg de proteína para la succinato deshidrogenasa y 18,98 ±4,6 nmol de O₂ consumido/min .mg de proteína para succinato oxidasa. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estas enzimas y el control (succinato deshidrogenasa p=0,012; succinato oxidasa p=0,03), indicando un daño en el

Complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial causado por el E de *S. officinalis* (Figura 27).

Figura 27. Efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial: NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, NADH reductasa, NADH oxidasa y succinato oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas con respecto al control succinato deshidrogenasa $p=0,012$; succinato oxidasa $p=0,03$.



8. DISCUSIÓN

8.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

Todas las especies del género *Salvia* presentan una composición química compleja con abundantes metabolitos de naturaleza terpénica: monoterpenos y sesquiterpenos, diterpenos (carnosol, rosmanol, epirosmanol, ácido carnósico) y triterpenos derivados del ursano y oleanano. Además poseen abundantes compuestos fenólicos: flavonoides con sustituyentes sobre el C-6 y ácidos fenólicos, principalmente ácido rosmarínico (Hernández *et al.*, 2002).

Diferentes autores coinciden en mencionar que la composición química general del aceite esencial de *Salvia officinalis* es α -tujona (18–43%), β -tujona (3–8.5%), alcanfor (4.5–24.5%), 1,8-cineol (5.5–13%), humuleno (0–12%), α -pineno (1–6.5%), canfeno (1.5–7%), limoneno (0.5–3%), linalool (1% máximo) y acetato de bornilo (2.5% máximo) (Ulubelen, 2000; Giannouli & Kintzios, 2000; Hernández *et al.*, 2002; ISO 9909, 1997; Raal *et al.*, 2007; Pierozan *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2013; Raina *et al.*, 2013). Sin embargo, la proporción de cada uno de ellos varía a nivel inter e intraespecífico, lo cual determina una gran cantidad de quimiotipos, establecidos en relación a la abundancia relativa de sus principales constituyentes (Giannouli & Kintzios, 2000), dependientes a su vez del genotipo, el medio específico en el cual se cultiva la planta (condiciones climáticas, localización geográfica), el órgano vegetal utilizado en la extracción, la época del año en que se haya recolectado y las condiciones de extracción (Giannouli & Kintzios, 2000; Santana *et al.*, 2012).

De esta manera, según Abu *et al.* (2013), hasta el momento se han caracterizado cinco quimiotipos del aceite esencial de *S. officinalis* de acuerdo a sus componentes mayoritarios: (1) Alcanfor > α -tujona> 1,8-cineol > β -tujona; (2) Alcanfor > α -tujona> β -tujona> 1,8-cineol;(3) β -tujona>alcanfor > 1,8-cineol> α -tujona; (4)1,8-cineol > alcanfor > α -tujona> β -tujona; y (5) α -tujona> alcanfor > β -tujona> 1,8-cineol.

El 1,8-cineol, también conocido como eucaliptol, constituye el componente mayoritario (26,6%) del aceite esencial de *S. officinalis* empleado en este trabajo, correspondiente al quimiotipo 4. Esta caracterización coincide con lo reportado por Arias (2102), quien también realizó una extracción por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) de plantas obtenidas del mismo departamento (Santander, municipio de Sucre), encontrando como compuesto mayoritario el 1,8-cineol (26,6%), seguido de α -tujona (18,3%), trans- β -Cariofileno (9,7%), viridiflorol (7,5%) y α -humuleno (5,4%).

En España, Santana *et al.* (2012) realizaron la caracterización química de diferentes especies de *Salvia* provenientes de una granja experimental encontrando el 1,8 cineol como principal constituyente del aceite esencial de *Salvia officinalis*, junto a los monoterpenos oxigenados α -tujona, linalol y alcanfor; los monoterpenos hidrocarbonados α -pineno, β -pineno y limoneno, y en menor proporción, el éster monoterpénico acetato de linalilo y el sesquiterpeno trans-cariofileno. Abu *et al.* (2013) también mencionan como componente mayoritario el 1,8-cineol, y en menor proporción α -tujona, en seis diferentes localidades en Jordania. En un estudio más reciente, Ali *et al.* (2015) caracterizaron diferentes especies del genero *Salvia* provenientes de semillas cultivadas en EU, encontrando como componentes mayoritarios de *S. officinalis* α -Tujona (25.8%), β -tujona (5.7%), alcanfor (6.4%), y 1,8-cineol (4.4%).

Cabe anotar que estos autores mencionan una relación inversa entre la cantidad de 1,8-cineol y α -tujona, pues a medida que el periodo vegetativo de la planta decae, disminuye a su vez la cantidad de 1,8-cineol, mientras que se presenta un aumento gradual de α -tujona. Teniendo en cuenta que estos dos componentes se encuentran en el aceite esencial evaluado, se podría inferir que la planta empleada para la extracción se encontraba en pleno periodo fenológico vegetativo, es decir, en crecimiento y desarrollo de raíces, tallos y hojas. Por supuesto, si las hojas de la planta se hubieran obtenido en otro periodo vegetativo, posiblemente la proporción de los componentes mayoritarios del aceite esencial serían diferentes.

8.1.1. Cribado virtual. Los parámetros de Lipinski contribuyen a determinar si una molecular en particular posee una adecuada absorción y penetración en sistemas biológicos de acuerdo al cumplimiento de varios parámetros. En el caso del coeficiente de partición 1-octanol/agua (LogP), los dos componentes demuestran ser lo suficientemente hidrofílicos para ser solubles en sangre, e hidrofóbicos para transportarse a través de las membranas celulares. Sin embargo, el 1,8-cineol mostró un valor más cercano al óptimo deseado (valor de 3). En cuanto a los parámetros solubilidad y peso molecular, los dos compuestos presentan valores óptimos, menores a 5 y a 500 respectivamente. Con el parámetro área de superficie polar topológica (TPSA), los valores obtenidos indican una buena permeabilidad en la membrana celular. Al evaluar los perfiles de riesgo mutagénico, solo el componente 1,8-cineol mostró riesgo irritante, lo cual podría limitar su uso potencial como repelente.

Los valores obtenidos en cada uno de los parámetros indican que los componentes mayoritarios del AE esencial de *S. officinalis* poseen una buena solubilidad, favoreciendo su efectividad para causar un efecto letal en aquellas fases de desarrollo del mosquito en la cual la penetración del compuesto ocurre por contacto directo con el medio. Si bien es cierto que este sería el primer modo de ingreso del AE al insecto, la alta permeabilidad en la membrana celular favorece el mecanismo de acción del aceite, haciendo que ingrese fácilmente al interior de las células.

En relación al uso comercial de estos compuestos, el 1,8-cineol arrojó un riesgo de generar efectos irritantes, lo cual indica que existe un alto riesgo para el hombre y para mamíferos si llegan a entrar en contacto prolongado en piel o mucosas, causando un efecto inflamatorio. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos compuestos no serían empleados de manera individual, sino que harían parte de una formulación de compuestos que actuarían de forma sinérgica, causando el menor daño posible a mamíferos y al ambiente.

8.2. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

8.2.1. Bioensayos actividad ovicida. Se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de eclosión y de inhibición de los huevos de 0-12 horas y de 0-72 horas, en los primeros se observa un comportamiento dosis-dependiente, con un mayor porcentaje de inhibición de la eclosión a 50 mg.L⁻¹. Por el contrario, en los huevos de 0-72 horas se observa una mayor inhibición de la eclosión a la menor concentración empleada (1mg.L⁻¹).

Teniendo en cuenta que la exposición de huevos de 0-12 horas fue más efectiva para la inhibición de la eclosión, resulta evidente que el tiempo de exposición, la concentración empleada y la edad de los huevos incide directamente en la actividad ovicida, sugiriendo un efecto toxico del AE directamente en el embrión, causando su muerte (Valarmathy *et al.*, 2011). En relación a los huevos de 0-72 horas, a pesar de los bajos valores de inhibición de eclosión, se debe recordar que las diferentes concentraciones del AE no solo inciden en los porcentajes de eclosión, sino que son capaces de causar diferentes tipos de daño morfológico en el embrión y la larva. Esto contribuye a explicar el alto porcentaje de las larvas emergidas que presentaron anomalías bajo las concentraciones más altas empleadas.

Los huevos de los mosquitos son mucho más tolerantes a la acción de diferentes compuestos al ser comparados con el estadio larval, pues están protegidos con una cubierta muy dura, la cual difiere bioquímicamente del integumento de la larva, creando una barrera para la penetración de cualquier compuesto a través de la cascara del huevo a medida que maduran (Phasomkusolsil & Soonwera, 2012). Sin embargo, Arivoli & Tennyson (2011) mencionan que algunos compuestos vegetales son capaces de inducir deformidades y efectos degenerativos, como los que se observaron en los embriones aclarados. Valarmathy *et al.* (2011), indican que un mayor tiempo de exposición a las diferentes concentraciones incrementa la entrada de los compuestos a través del cascara, aumentando su efectividad y afectando la embriogénesis. En este estudio se observaron porcentajes más altos de anomalías en huevos de 0-12 horas (1mg.L⁻¹: 2,50%; 5mg.L⁻¹:18,9%; 37mg.L⁻¹:12,8%; 50mg.L⁻¹:27,59%), relacionándose posiblemente con la eficacia que poseen los compuestos de *S. officinalis* para penetrar a través del

corion en el huevo. Por lo general, el corion es más resistente a la desecación y a la acción de compuestos externos dos horas después de la ovoposición. Durante este lapso de tiempo ocurren modificaciones estructurales en sus proteínas constitutivas, llevándolo a su insolubilización (Rezende *et al.*, 2008; Devillers *et al.*, 2014). Es precisamente durante este periodo de tiempo que los componentes del AE de *S. officinalis* pueden penetrar en el huevo y ejercer su acción ovicida, o causar malformaciones, especialmente el compuesto mayoritario 1,8-cineol. Posterior a estas dos horas, el ingreso del aceite esencial al huevo puede realizarse a través en menor cantidad a través de los pequeños poros en la superficie del corion.

Con respecto a los patrones de eclosión, los huevos de 0-12 horas presentaron los valores más altos, lo cual puede estar relacionado directamente con los daños generados en el embrión, o a un daño en la conformación estructural del corion, que impediría una eclosión normal del mismo. En relación a las larvas, el tipo de daño que predominó fue la poca quitinización cefálica, observada en su mayoría en los huevos de 0-72 horas. Cabe mencionar que las larvas que presentaron esta característica se encontraban en el mismo estadio de desarrollo, y que este tipo de daño continuó hasta el cambio de fase a pupa. Nuevamente, el tiempo de exposición a los componentes del AE juega un importante papel en la efectividad de la inhibición de la síntesis de quitina, haciendo que tengan un integumento más débil (Arivoli & Tennyson, 2011), pues cualquier tipo de daño causado desde el embrión, incidirá en los posteriores fases de desarrollo. Arivoli & Tennyson (2011), mencionan que las anomalías metamórficas causadas en estadios tempranos de desarrollo, causan subsiguientes anomalías en pupas y adultos, representados en actividad pupicida, o en alteraciones en la emergencia de los adultos.

Aun cuando podría esperarse que los porcentajes de inhibición de la eclosión fueran más altos en huevos 0-72 horas, es importante resaltar que durante este periodo de tiempo el embrión se desarrolló completamente, de manera que durante los procesos de desarrollo del mismo, el efecto del aceite esencial este representado en alteraciones fisiológicas de tipo hormonal. Este tipo de alteraciones son similares a las observadas con piriproxifen (análogo de la hormona juvenil) y la azadiractina (agonista de la ecdisona u hormona de la muda) (Suman *et al.*, 2013), donde los efectos son observables en el desarrollo posterior

de fases larvales, representados en escasa quitinización cefálica, malformaciones a nivel de tracto digestivo y comportamiento, tal como se observó en este estudio. Aunque en los resultados no se mencionan a normalidades en los tiempos de desarrollo de cada estadio, ni pupas y adultos, cabe mencionar que en algunos casos concretos se observó un aumento en la duración del estadio larval, mortalidad pupal y alteraciones en la emergencia de adultos.

8.2.2. Actividad larvicida. En el presente estudio se observó un aumento en el porcentaje de mortalidad de larvas en relación con la concentración de aceite esencial de *S. officinalis* (mortalidad dosis-dependiente), siendo 76 mg.L⁻¹ la mayor dosis empleada. El tiempo de exposición de las larvas de *S. aegypti* a un aceite esencial constituye un factor de influencia importante para los valores de Concentraciones Letales (CL), ya que los valores calculados para CL₅₀ y CL₉₀, aumentaron de 76.43 a 77.5 mg.L⁻¹ y de 123.92 a 198.20 mg.L⁻¹ a las 24 y 48 horas de exposición respectivamente.

Las plantas de la familia Lamiaceae han sido ampliamente estudiadas por su actividad larvicida contra mosquitos. Sin embargo, algunas especies de *Salvia* muestran una moderada actividad larvicida, con valores de CL₅₀ entre los 100 y 250 mg.L⁻¹ (Arivoli & Tennyson, 2011). Los valores encontrados de CL₅₀ y CL₉₀ del presente estudio son más bajos que lo reportado por Pavela (2008), quien estudio la actividad larvicida de 56 especies de plantas de la región Euro-Asiática, entre ellas *S. officinalis*, encontrando una mortalidad de 84,6% con una DL₅₀ de 159 mg.L⁻¹ y una DL₉₀ >500 mg.L⁻¹ en larvas de *Culex quinquefasciatus*. En esta publicación, *S. officinalis* no fue considerada como un agente larvicida de importancia al ser comparada con los resultados obtenidos en otras plantas.

Sin embargo, Ali *et al.* (2015) evaluaron la toxicidad de diferentes especies de *Salvia* en larvas de *S. aegypti*, reportando una CL₅₀ de 56.9 mg.L⁻¹ y CL₉₀ de 92.4 mg.L⁻¹. Abou (2014), reporta una CL₅₀ de 25.1 mg.L⁻¹ y CL₉₀ de 120.5 mg.L⁻¹ a las 24 horas de exposición, y una CL₅₀ de 18.4 mg.L⁻¹ y CL₉₀ de 106.8 mg.L⁻¹ a las 48 horas. Aunque las concentraciones letales obtenidas por estos autores son más bajas que las reportadas en este estudio, es importante mencionar que los componentes mayoritarios reportados

viridiflorol (20,4%) y α -tujona (25,8%) en el caso de Ali *et al.* (2015), y miristicina (20,58%), sabineno (15,37%) y 4-terpineol (14,92%) en el caso de Abou (2014), son notablemente diferentes a los reportados aquí, relacionándose directamente con el lugar de procedencia de las plantas: Estados Unidos (Ali *et al.*, 2015) y Túnez (Abou, 2014).

Adicionalmente, es bien conocido que la actividad biológica de los aceites esenciales puede ser debida a varios compuestos, los cuales pueden actuar juntos o independientemente para causar mortalidad. En este sentido, se ha reportado que el contenido de terpenoides en el aceite esencial de *S. officinalis* (tujona, alcanfor y cineol) posee un fuerte efecto larvicida contra otras especies de mosquitos, como *Anopheles* y *Culex* (Abou, 2014).

En nuestro caso, el componente mayoritario de *S. officinalis*, 1,8-cineol, ha sido reportado con acción insecticida contra diversas especies de insectos, aun siendo extraído de otras especies de plantas (Leyva *et al.*, 2009). Kishore *et al.* (2011) mencionan que el 1,8-cineol aislado de hojas de *Hyptis martiusii* mostro un efecto larvicida en *S. aegypti* a concentraciones de 25 (10% mortalidad), 50 (53% mortalidad) y 100 (100% mortalidad) mg.mL. Lucia *et al.* (2007), evaluaron la actividad larvicida de *Eucaliptus grandis* y sus componentes mayoritarios, y reportan que el 1,8-cineol presento una baja actividad larvicida, con una CL₅₀ de 57.2 mg.L⁻¹. Se ha mencionado que otros metabolitos presentes en menor proporción en el aceite esencial, pueden ejercer una acción sinérgica letal contra el insecto, y que dichos metabolitos varían en relación a diferentes factores (Leyva *et al.*, 2009), relacionados con el desarrollo y crecimiento de la planta.

El uso de aceites esenciales en el control de larvas de mosquitos es un método que busca minimizar el efecto tóxico de algunos compuestos xenobióticos en el medio ambiente, facilitado a su vez por la acción de diferentes sustancias que puedan estar disueltas en el agua o presentes en los sedimentos de los cuales se alimentan las larvas (Tennyson *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos con *S. officinalis* ofrecen una alternativa viable de uso, pues en bajas concentraciones ofrecen un gran potencial larvicida al controlar el vector mediante la interrupción de su ciclo de vida antes de la dispersión o adquisición del virus.

8.2.3. Actividad pupicida. Las pupas de *S. aegypti* poseen una fuerte esclerotización de la cutícula a medida que se acerca el tiempo de eclosión del adulto, pasando de presentar una capa delgada, suave e incolora, a una cutícula más oscura y gruesa antes de la emergencia del adulto (Popa *et al.*, 2011). Este grado de esclerotización de la cutícula contribuye a una menor susceptibilidad de este estadio frente a la acción de agentes externos (Ramar *et al.*, 2013), bien sea de origen sintético o natural.

Considerando que la pupa es más resistente, son escasos los estudios que reportan la actividad pupicida de aceites esenciales en mosquitos, llegando a emplearse altas concentraciones de aceite esencial para obtener un 100% de mortalidad. Aunque no se encontraron estudios en la literatura que involucren el efecto de *S. officinalis* en pupas de *S. aegypti*, al examinar las concentraciones empleadas en diferentes estudios bajo la acción de distintas especies de plantas, se evidencia un comportamiento directamente proporcional a la concentración empleada, indistintamente si esta se presenta en partes por millón, usualmente entre 160 y 1000 mg.L⁻¹ (Geiser *et al.*, 2007; Ramar *et al.*, 2013); o en µL/mL, entre 100 y 1000 µL/mL (Sivagnaname & Kalyanasundaram, 2004; Souza *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Phasomkusolsil & Soonwera, 2013), reportándose acción pupicida solo a las concentraciones más altas empleadas por cada investigador.

Es importante señalar que las concentraciones empleadas en el presente trabajo evidenciaron porcentajes de mortalidad superiores al 50% a las 48 horas de exposición con el AE de *S. officinalis* en concentraciones que no superan los 400 mg.L⁻¹. Teniendo en cuenta que las pupas empleadas para el bioensayo tienen menos de 24 horas de emergencia, es decir, presentan una cutícula menos esclerotizada, es posible que la mortalidad observada se relacione a la acción por contacto con los componentes del AE presentes en el medio líquido, más aun si se tienen en cuenta los valores de solubilidad en membranas lipídicas de sus componentes mayoritarios. Teniendo en cuenta que la cutícula de los insectos se compone de diferentes regiones que difieren notablemente con respecto a su composición química y propiedades, algunos estudios consideran que existe un valor de polaridad ideal para la entrada de xenobióticos en el organismo. Este valor de polaridad media permitiría una óptima velocidad de penetración cuticular (Lucia *et al.*, 2013), que sumado a la alta permeabilidad en membranas y la solubilidad de los

componentes mayoritarios del AE observados en el análisis *in silico*, favorecería el ingreso del AE a la pupa a través del agua circundante.

Resulta oportuno mencionar que la pupa no se alimenta, por lo que el contenido de tejido lipídico es mayor que en cualquier otro estadio, sumado a que cualquier mecanismo que reduzca el gasto calórico durante este periodo tiene una influencia directa en la capacidad del mosquito para sobrevivir, o en la emergencia del adulto (Lucas & Romoseri, 2001). Los componentes 1,8-cineol y α -tujona pueden estar ingresando por contacto directo al estar disueltos en el agua, ejerciendo un efecto tóxico y de alteración del metabolismo al incidir en el gasto calórico, vital para alcanzar la fase adulta.

8.2.4. Actividad adulticida. Se encontró que el AE de *S. officinalis* causo un efecto adulticida con un comportamiento directamente proporcional a la concentración empleada a partir de los 2 minutos de exposición; un promedio de mortalidad de 53% a los 60 minutos y una mortalidad del 100% a las 24 horas para todas las concentraciones evaluadas. Esta actividad es frecuentemente atribuida a una compleja mezcla de compuestos. En ese sentido, Abou (2014) utilizó vapores tóxicos del AE de *S. officinalis* en *Culex pipiens* y *S. aegypti*, encontrando un mayor efecto adulticida en *S. officinalis*, con DL₅₀ de 0,34 mg/mat y DL₉₀ de 1,92 mg/mat.

Teniendo en cuenta que son escasos los estudios que evalúan el AE de *S. officinalis* sobre adultos de *S. aegypti*, se comparó la acción del 1,8-cineol (compuesto mayoritario conocido comúnmente como eucaliptol) en el mosquito. Los tiempos de acción reportados en el presente estudio, coinciden por lo publicado por Lucia *et al.* (2009) quienes obtuvieron un mayor efecto fumigante de este compuesto mayoritario al ser comparados con otros, con un tiempo knockdown (KT_{50min}) entre 4.95–5.73, atribuible a un efecto neurotóxico de este compuesto. Lucia *et al.*, (2012) evaluaron la acción fumigante de 15 plantas del genero *Eucalyptus*, encontrando un KT₅₀ entre 10.65–0.076 minutos para las especies con altos contenidos de 1,8-cineol.

Los aceites esenciales que contienen monoterpenos causan intoxicaciones neurotóxicas similares a las producidas por los organofosforados y carbamatos, inhibiendo la enzima

acetilcolinesterasa (Lucia *et al.*, 2013). En el presente estudio, los compuestos mayoritarios 1,8-cineol y α -tujona juegan un importante papel adulticida debido a que los dos presentan efectos neurotóxicos en los mosquitos, representados en un efecto knockdown (Lucia *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2015). Al ser monoterpenos volátiles, estos compuestos entran al organismo a través de las tráqueas y tráqueolas, entrando en circulación a través de estos conductos hasta llegar a la hemolinfa, siendo absorbidos por proteínas y esparcidos a través del cuerpo del insecto (Lucia *et al.*, 2013). Lucia *et al.* (2012) mencionan que los aceites esenciales ricos en 1,8-cineol muestran una correlación positiva con el efecto knockdown, considerándolo como un producto con gran futuro comercial en el control de insectos.

8.2.5. Actividad de repelencia a la picada de los mosquitos. Generalmente, la primera línea de protección frente a la picada de un mosquito es la aplicación de un repelente, cuya definición incluye a las sustancias que actúan localmente o a cierta distancia, causando un efecto evasivo por parte de los mosquitos adultos, evitando la picadura (Neiro *et al.*, 2010; Jaramillo *et al.*, 2012).

En relación a estudios de repelencia con productos naturales como los AEs, se han investigado diferentes familias de plantas que contienen cocteles químicos que actúan como repelentes, anulando la atracción de un insecto al recurso (Jaramillo *et al.*, 2012; Leyva *et al.*, 2012). Investigaciones previas indican que algunas especies del género *Salvia* poseen actividad repelente contra mosquitos como *Aedes albopictus* y especies de *Culex*. Conti *et al.* (2012) reportaron que los AEs de *S. sclarea*, *S. dorisiana*, *S. longifolia* presentan una significativa actividad repelente frente a *Aedes albopictus*. *S. dorisiana* presentó un porcentaje de eficacia del 91-95% con un tiempo de protección entre 9.2 a 92.4 minutos; *S. longifolia* un tiempo de protección entre 3.6 y 64.2 min y *S. sclarea* entre 3.6 y 64.2 min. Amer & Melhorn (2006) reportan una actividad repelente de 45.9% en un periodo de 120 minutos de *S. sclarea* frente a *S. aegypti*. Kang *et al.* (2009) encontraron una baja actividad repelente de *S. officinalis* contra *Culex pipiens*.

Los resultados obtenidos (48% de repelencia entre 2 a 15 minutos), es un valor bajo frente a valores de 90% de repelencia con AEs durante dos horas o más reportados en

los estudios anteriores. Este efecto puede deberse a que los repelentes funcionan creando una barrera de vapor que evita que el insecto entre en contacto con la superficie de la piel (Neiro *et al.*, 2010), pero esta misma fase de vapor de los AEs los hace eficaces solo durante un periodo de tiempo relativamente corto debido a la alta volatilidad de sus componentes (Leyva *et al.*, 2012). Por ello, en el caso del AE de *Salvia officinalis* se debe considerar una formulación que contribuya a estabilizar sus componentes volátiles y mejorar los tiempos de protección.

No se debe desconocer que aunque el tiempo de exposición evaluado fue corto, la efectividad y la duración de la repelencia depende de múltiples factores, incluyendo el tipo de componentes involucrados (Phasomkusolsil & Soonwera, 2011). Algunos autores plantean que algunos monoterpenos como α -pinene, cineole, eugenol, limoneno, terpinolene, citronellol, citronellal, alcanfor y timol presentan actividad insecticida sobre mosquitos adultos como repelentes naturales (Neiro *et al.*, 2010; Leyva *et al.*, 2012; Abou, 2014). No obstante, este efecto no solo puede atribuirse a esos componentes, pues la bioactividad está asociada con la presencia conjunta de monoterpenos y sesquiterpenos en el AE (Neiro *et al.*, 2010; Leyva *et al.*, 2012); tal como ocurre con *S. officinalis*.

De esta manera, los resultados obtenidos indican que el AE de *S. officinalis* constituye un elemento de disuasión de la picada, pues tal como lo describen Phasomkusolsil y Soonwera (2011) al relacionar el porcentaje de repelencia con el de picadura, si tanto el porcentaje de protección y de picadura son bajos, el aceite se convierte en un elemento de disuasión de la picadura. Si tanto el porcentaje de protección y de picadura son altos, el aceite es más repelente que disuasivo de la alimentación. Y por último, si el porcentaje de protección de un aceite es alto y el porcentaje de picadura es bajo, el aceite es eficaz para repeler mosquitos y disuadir la picadura.

Ali *et al.* (2015) publicaron el efecto de disuasión de la picada de diferentes especies de *Salvia*, entre ellas *S. officinalis*, con un bajo valor de disuasión de la picada (0,63) frente a *S. aegypti*. La disuasión de la picada obtenida puede estar relacionada con algunos compuestos individuales, los cuales son detectados por un receptor específico olfativo (RO) de la antena de los mosquitos (ubicados en las sensilas), que en combinación con

las enzimas degradadoras de olor (EDOs) reconoce el estímulo (Jaramillo *et al.*, 2012). Si el compuesto del AE actúa inhibiendo la actividad o producción de las enzimas EDOs, el receptor específico olfativo (RO) continua funcionando aun cuando no habrían enzimas para descomponerlo, lo cual causaría confusión y desorientación en los insectos, haciéndolos incapaces de localizar su objetivo (Jaramillo *et al.*, 2012).

8.2.6. Actividad deterrente. En este estudio los porcentajes de efectividad en la Inhibición de la ovoposición fueron superiores al 80%, indicando que las hembras son sensibles al olor del AE. La acción de restricción de ovipostura de huevos ocurre debido a que el sistema sensorial de los insectos, es capaz de detectar los compuesto volátiles del AE de *S. officinalis*, que al degradarse en el medio de ovoposición, producen metabolitos secundarios que actúan juntos o independientemente para evitar la postura de huevos (Navarro *et al.*, 2009; El-Gendy & Shaalan, 2012).

Davis & Bowen (1994) mencionan que los mosquitos emplean señales físicas y químicas para detectar potenciales sitios de ovoposición mediante receptores sensoriales en las antenas, los cuales responden a estímulos específicos dependiendo del estado de desarrollo. De esta manera, las hembras grávidas serán más propensas a buscar sitios adecuados de ovoposición, con un color y densidad óptica del agua adecuada, textura, humedad y temperatura del sustrato de ovoposición (Guha *et al.*, 2012).

Solo están disponibles unos pocos estudios sobre el potencial deterrente de AEs de diferentes plantas, y aún menos de *S. officinalis*. Se ha reportado que los compuestos flavonoides y las formulaciones basadas en Neem reducen la ovoposición e inciden en la fertilidad y fecundidad de *S. aegypti* (Guha *et al.*, 2012). Sin embargo, el AE de *S. officinalis* posee monoterpenos y sesquiterpenos, que por su volatilidad pueden causar una acción evasiva por parte de las hembras a estos compuestos, actuando como semioquímicos (Navarro *et al.*, 2009). Estos datos soportan los valores obtenidos para el Índice de actividad de la oviposición (OAI), pues los valores evaluados en las tres concentraciones fueron cercanos a -1, indicando un alto potencial de acción deterrente frente a *S. aegypti*.

8.3. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

8.3.1. Presencia/ausencia de degradación de ADN total de *Stegomyia aegypti*. Al comparar los tres ensayos de fragmentación de ADN total de *S. aegypti*, se observó que con larvas tratadas previamente con el AE de *S. officinalis*, no hubo ningún patrón de degradación de ADN. En este gel, el único patrón de degradación corresponde a larvas tratadas con Camptotecina, un alcaloide citotóxico que inhibe la enzima Topoisomerasa 1 del ADN, causando la degradación del ADN. Este resultado puede relacionarse con lo observado en los bioensayos de actividad larvicida, pues al tratarse de larvas previamente expuestas a concentraciones similares, la mortalidad observada fue menor a la reportada por otros autores, lo cual indica que el mecanismo de acción primario causante de la mortalidad no ocurre por daño directo en el ADN, sino por otro mecanismo. Los patrones de degradación observados al adicionar AE directamente en el ADN, corroboran lo mencionado anteriormente, pues si bien es cierto que se observó un mayor patrón de degradación bajo las concentraciones empleadas, se esperaba encontrar un comportamiento similar al observado en el control positivo (Camptotecina).

El único ensayo en el que se observó una degradación total del ADN fue al adicionar el AE de *S. officinalis* durante la homogenización de las larvas, pues al ser comparado con el control positivo, se observó una degradación total del ADN. Aunque no existen datos disponibles sobre la genotoxicidad del AE de *S. officinalis* en *S. aegypti*, existe evidencia de que los monoterpenos pueden causar efectos citotóxicos mediante la inducción de apoptosis (Dörsam *et al.*, 2015). Sin embargo, la magnitud del daño causado por el AE indica que corresponde a necrosis, actuando posiblemente sobre proteínas nucleares, específicamente sobre aquellas encargadas de la reparación del ADN.

Teniendo en cuenta que varios autores han reportado que las especies del género *Salvia* se caracterizan por poseer un efecto antioxidante (Abu *et al.*, 2013; Vaško *et al.*, 2014), Ramos *et al.* (2010) mencionan que los efectos de los polifenoles presentes en *S. officinalis* actúan bajo tres posibles mecanismos: 1. Un mecanismo antioxidativo en el cual los polifenoles buscan las H_2O_2 , reduciendo la cantidad de daño al DNA; 2. Reparación enzimática, en la cual los polifenoles promueven la reparación enzimática espontánea; y

3. Reparación no-enzimática, en la cual los polifenoles rápidamente reparan el ADN dañado como resultado del H₂O₂. De esta manera, es posible que las células al perder su integridad morfológica durante el proceso de homogenización, se hubiera causando la inactivación de alguno de estos mecanismos de reparación frente a ROS, causando una inminente degradación total del ADN.

Jantová *et al.* (2014) reportan que el extracto de *S. officinalis* a diferentes concentraciones es capaz de inducir la apoptosis en células de ratón, mediante la activación de las caspasas 3 y 9, con una disminución del potencial de membrana mitocondrial. Es decir, a través de la vía intrínseca caspasa-dependiente. Los resultados obtenidos en el presente documento no permiten afirmar con precisión que este sea el mecanismo de acción en *S. aegypti* pues se deben realizar pruebas más específicas que permitan valorar el proceso de necrosis (muerte celular debida a agentes externos) -apoptosis (muerte celular programada) que causa el AE.

8.3.2. Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa. Una de las principales características de los terpenoides es su esqueleto hidrocarbonado, el cual les confiere ciertas propiedades hidrofóbicas. Muchos compuestos hidrofóbicos están asociados con la desactivación de proteínas e inhibición de enzimas, siendo la acetilcolinesterasa una enzima particularmente susceptible a estos compuestos (Ryan & Byrne, 1988).

La acetilcolinesterasa (AChE), es una enzima esencial en las sinapsis colinérgicas de todos los animales, pues termina el impulso nervioso mediante la hidrólisis rápida del neurotransmisor acetilcolina en el espacio sináptico. En insectos, la AChE es una enzima clave del sistema nervioso en el que el sistema colinérgico es esencial, y ha sido estudiada principalmente en relación con la resistencia a insecticidas, ya que es la diana de los insecticidas organofosforados y carbamatos, siendo su insensibilidad uno de los principales factores que conlleva al desarrollo de mecanismos de resistencia (Revuelta, 2010).

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de AChE comercial muestran una fuerte actividad tóxica del AE de *S. officinalis* correlacionada con un efecto inhibitorio de la

enzima acetilcolinesterasa (AChE), indicando un posible *target* de acción del AE. Los compuestos que inhiben o activan la AChE causan la acumulación de acetilcolina en el sitio de unión colinérgico, causando una estimulación continua de las fibras nerviosas a través del sistema nervioso periférico y central, seguido por parálisis y muerte (Ryan & Byrne, 1988).

Aunque los efectos observados en los ensayos de bioactividad larvicida, pupicida y adulticida, pueden estar relacionados con este mecanismo de acción, debe tenerse en cuenta la habilidad de los diferentes compuestos para penetrar la cutícula, las barreras intestinales y las diferentes solubilidades en la hemolinfa de los insectos (Ryan & Byrne, 1988), pues esos factores influyen en la migración de los diferentes compuestos a los sitios colinérgicos. Cabe mencionar que la AChE también tiene funciones en el sistema sensorial periférico de la antena de los insectos (Ryan & Byrne, 1988), llegando a causar alteraciones en la percepción de señales químicas de atracción a un huésped o de búsqueda de potenciales lugares de ovoposición.

Entre los compuestos que causan una fuerte inhibición de la AChE en insectos se encuentran aquellos con una fracción monoterpénica, especialmente aquellos clasificados como monoterpenos oxigenados, como el 1,8-cineol (Orhan *et al.*, 2008; Porres *et al.*, 2013). Al-Sarar *et al.* (2014) reportan que este compuesto no solo actúa en la AChE, sino también en los receptores de octopamina, los cuales son muy usados durante fases de desarrollo de alto gasto energético (largos periodos de inanición, ovoposición). La presencia de este *target*, constituye una ventaja en el uso de *S. officinalis* como controlador, pues sería más tóxico para los insectos que para mamíferos.

8.3.3. Mecanismo de acción mitocondrial. El efecto del AE de *S. officinalis* sobre la respiración mitocondrial, mostró que al adicionar el AE de *S. officinalis* en el Estado 3 (en presencia de ADP), se presentó una disminución en el consumo de oxígeno para los dos sustratos, un 35,5% en promedio para glutamato y del 48 % para succinato en todas las concentraciones evaluadas. Para el estado 4 (en ausencia de ADP), se observó que aunque el promedio de consumo de oxígeno para Glutamato fue del 96.3% en todas las concentraciones, con la CL₅₀ este aumentó en un 28.5%. Para el sustrato succinato se

observó un aumento del 49% en el consumo de oxígeno al adicionarle bajas concentraciones del AE (CL₁₀), mientras que con la concentración más alta (CL₅₀) el consumo de oxígeno disminuyó en un 11%.

Como resultado de los efectos inhibitorios y estimulantes de las concentraciones del AE de *S. officinalis* en los estados 3 y 4, los valores del coeficiente de control respiratorio (CCR) disminuyeron para el sustrato glutamato (45% en promedio) y aumentaron en un 27% en promedio para el sustrato succinato.

En el Estado 4 el sustrato succinato dona sus electrones al Complejo II, y dado que se adicionó rotenona como inhibidor específico del Complejo I, la velocidad de consumo de O₂ observada confirma un daño en este complejo. Teniendo en cuenta que el Complejo II conecta directamente la cadena respiratoria al ciclo de Krebs mediante la oxidación de succinato a fumarato, el AE de *S. officinalis* puede estar ocasionando un efecto similar al observado con el químico Malonato, inhibidor competitivo de la enzima succinato deshidrogenasa, facilitando que todo el NAD⁺ se transforme en NADH + H⁺ e interrumpiendo la producción de equivalentes de reducción (Cámara, 2005).

Barros (2012) menciona que la inhibición del Complejo II de la cadena mitocondrial mediante Malonato no solo reduce la producción de ATP, además provoca la muerte celular a través de diversos mecanismos que incluyen la excitotoxicidad secundaria mediada por la entrada masiva del calcio (específicamente en células neuronales), la formación de radicales superóxido y la generación de apoptosis. Aunque es poco lo que se conoce sobre el efecto del Malonato en *S. aegypti*, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el AE de *S. officinalis* presenta un mecanismo de acción similar, tal vez no como competidor de la enzima succinato, pero sí impidiendo que se lleve a cabo la oxidación adecuada del sustrato. De esta manera, el AE causaría la disminución de la síntesis de ATP, un aumento en la permeabilidad de la membrana celular con pérdida de los potenciales eléctrico e iónico, desacoplamiento de las funciones metabólicas y de membrana, daño celular progresivo y muerte celular por necrosis (Arias, 1999).

- **Actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial**

Al analizar cada uno de los complejos mitocondriales, se evaluó el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria independientemente de otro tipo de procesos dependientes de la integridad de la membrana, como la formación de potencial de membrana y la fosforilación, y de esta manera facilitar la identificación del efecto inhibitor o estimulante del AE de *S. officinalis* sobre los complejos mitocondriales.

Para el Complejo I de la cadena respiratoria, se evaluó la NADH deshidrogenasa y la NADH oxidasa. En los resultados obtenidos se observó un leve aumento en la actividad de la NADH deshidrogenasa, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas, lo que indica que el AE a una CL₅₀ parece no afectar la transferencia de electrones desde el NADH⁺ hasta la Ubiquinona (Q), ni el ingreso. De igual manera, no se observó un efecto del AE para la NADH oxidasa, revelando que la oxidación del NADH⁺ a NAD⁺ desde la NADH deshidrogenasa, pasando por la citocromo c reductasa (Complejo III) y finalizando en la citocromo c oxidasa (Complejo IV) se realiza de forma normal. Al evaluar el paso de los electrones del glutamato al citocromo c, no se observó ninguna diferencia estadística con el control, indicando que el Complejo III no presentó ningún tipo de daño con el AE de *S. officinalis*.

Para el Complejo II fueron evaluadas las enzimas succinato deshidrogenasa y succinato oxidasa, en las cuales se observó una disminución significativa con respecto al control. Este resultado sugiere que el paso de electrones desde el succinato hacia el FAD, y del succinato hasta el oxígeno (succinato oxidasa) no se produce de manera normal, debido a que no están ingresando electrones vía succinato-fumarato y tampoco se están transportando hacia el oxígeno, en el complejo IV.

De esta manera, parece que el AE de *S. officinalis* ocasiona algún tipo de efecto bloqueador en el Complejo II, ocasionando que no ingresen electrones a través de este complejo a la cadena respiratoria mitocondrial y afectando la producción de ATP. Adicionalmente, el AE no afecta los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

En términos generales, el aceite esencial de *Salvia officinalis* presentó un efecto biocida en todos los estadios de desarrollo del mosquito *Stegomyia aegypti*. Sin embargo, su efecto fue más pronunciado en los estadios de huevo, pupa y adulto (mortalidad y actividad deterrente). Al relacionar la actividad biocida con los mecanismos de acción evaluados, es posible que las mortalidades observadas fueran causadas debido al bloqueo en el ingreso de electrones a la cadena respiratoria vía complejo II. Este bloqueo ocasiona una deficiente producción de ATP, desencadenando en un funcionamiento ineficaz de la maquinaria celular, y por ende, de diferentes procesos fisiológicos como regulación hormonal, almacenamiento de energía y producción de mecanismos de protección frente a agentes externos. Por otro lado, la alteración en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa explica la mortalidad observada en los adultos, ocasionando el efecto knockdown, sin recuperación de las funciones colinérgicas en el insecto.

9. CONCLUSIONES

Los valores de los parámetros de Lipinski indican que los componentes mayoritarios del AE de *Salvia officinalis*, 1,8-cineol y α -tujona, son altamente permeables en membranas biológicas, facilitando el ingreso de estos compuestos al sistema fisiológico del mosquito *S. aegypti* por contacto (agua, aire) o por ingestión.

Aunque el 1,8-cineol mostro valores de alta permeabilidad en membranas biológicas, evidencio un perfil de riesgo alto para efectos irritantes en mamíferos, lo cual limitaría su potencial uso a futuro para el control de *S. aegypti*.

El AE de *S. officinalis* empleado en este estudio se caracteriza por pertenecer al quimiotipo 4, caracterizado con el monoterpeno 1,8-cineol como componente mayoritario (26,6%); con reconocidas propiedades biológicas y de acción específica.

El aceite esencial de *Salvia officinalis* presenta efectos específicos en cada una de las fases de desarrollo de *S. aegypti*, y este efecto puede ser causado por la acción sinérgica de sus componentes e incrementado por la vía de penetración al insecto (Ingestión, contacto).

El AE de *S. officinalis* muestra un efecto ovicida, no solo al causar inhibición en la eclosión, sino también al ocasionar malformaciones en el embrión y pérdida de esclerotización en larvas emergidas.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos para pupas y larvas bajo el efecto de diferentes concentraciones del AE de *S. officinalis* son bajos al ser comparados con otros estudios, pero contribuyeron a dilucidar el modo de acción del AE.

La actividad adulticida del AE mostró mejores resultados frente a la actividad repelente, pues el componente mayoritario 1,8-cineol, es capaz de causar un reconocido efecto

knockdown debido a la volatilidad de este compuesto, representado a su vez en cortos tiempos de protección frente a picaduras.

Los porcentajes observados de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa con el AE pueden estar relacionados con la acción del componente mayoritario 1,8-cineol, indicando que tal vez sea este el mecanismo de acción del AE que explica la mortalidad observada en adultos de *S. aegypti*.

Los ensayos realizados en este estudio demuestran que el mecanismo de acción del AE de *S. officinalis* parece estar relacionado con el bloqueo del ingreso de electrones al Complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, ocasionando una alteración en la producción neta de ATP.

El AE de *S. officinalis* tiene un gran potencial para ser empelado en programas de control integrado de mosquitos, ya sea para evitar la ovoposición de las hembras en potenciales criaderos, o como adulticida.

10.RECOMENDACIONES

Se debe evaluar la bioactividad de los componentes mayoritarios de *S. officinalis*, 1,8-cineol y α -tujona en *S. aegypti*, con el fin de conocer si estos componentes son los causantes de la actividad biocida observada, o se debe a un efecto sinérgico del AE.

Teniendo en cuenta que los componentes del AE de *S. officinalis* son muy volátiles, se debe tener en cuenta el diseño de una formulación básica que estabilice estos compuestos y permita la evaluación de la actividad repelente por un periodo de tiempo mayor.

Aunque se pudo establecer que el daño causado en el ADN por el AE de *S. officinalis* no es el mecanismo principal de acción del aceite, es necesario realizar pruebas específicas de apoptosis que permitan dilucidar y comprender con mayor claridad la degradación observada en los geles de agarosa.

Las pruebas realizadas en acetil-tiocolina permiten afirmar que el AE *S. officinalis* ocasiona una disminución en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa directamente proporcional a la concentración, sin embargo, es necesario realizar esta prueba con sustrato proveniente de larvas de *S. aegypti* y corroborar su acción en el mosquito.

BIBLIOGRAFIA CITADA

ABOU, Z. Insecticidal bioactivity of eco-friendly plant origin chemicals against *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2014. Journal of Entomology and Zoology Studies. 2 (6): 340-347.

ABU-DARWISH, M.; CABRAL, C.; FERREIRA, I.; GONÇALVES, M.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M.; AL-BDOUR T.; SALGUEIRO L. Essential Oil of Common Sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and Anti-Inflammatory Potential. 2013. BioMed Research International. 20 (13).

ACIOLE, S.; PICCOLI, C.; DUQUE, J.; COSTA, C.; NAVARRO –SILVA, M.; MARQUES, F.; SALES MAIA, M.; PINHEIRO, M.; REBELO, M. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2011. Revista Colombiana de Entomología. 37 (2): 262-268.

AHERNE, S.; KERRY, J.; O'BRIEN, N. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. 2007. British Journal of Nutrition. (97): 321–328.

AMER, A.; MEHLHORN, H. 2006. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes Anopheles* and *Culex* mosquitoes. Parasitology Research. 99: 478–490.

ALI, A.; TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; BLYTHE, E.; ALI, Z.; CAN BASER, K.; KHAN, I. Chemical composition and biological activity of four salvia essential oils and individual compounds against two species of mosquitoes. 2015. Journal of Agricultural Food and Chemistry. 63: 447–456.

ALMEIDA, J., CARPES, S., VICENTE, M., SERAFINI, L., PEREIRA, D. Atividade Antioxidante in vitro e Microencapsulação por spray drying de extrato hidroalcoólico de *Salvia* (*Salvia officinalis* L.). 2014. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos. 5(2): 41–49.

AL-SARAR, A.; HUSSEIN, H.; ABOBAKR, Y.; BAYOUMI, A.; AL-OTAIBI, M. Fumigant toxicity and antiacetylcholinesterase activity of Saudi *Mentha longifolia* and *Lavandula dentata* Species against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). 2014. Türkiye Entomoloji Derneği & Dergisi. 38 (1): 11-18.

ARIAS, J. Fisiopatología quirúrgica. 1999. Editorial Tebar. 564.

ARIAS MOYANO, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citridora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). 2012. Trabajo de grado para optar a Magister. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.

ARIVOLI, S.; TENNYSON, S. Studies on the Mosquitocidal Activity of (L.) *Spreng* (Rutaceae) leaf extracts against, and (Diptera: Culicidae). 2011. Asian Journal of Experimental Biological Sciences. 2(4) 2011: 721-730.

ARIVOLI, S.; TENNYSON, S. Mosquitocidal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit (Lamiaceae) extracts against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). 2011. International Journal of Recent Scientific Research. 2 (5): 143 -149.

ÁVALOS, A.; PÉREZ, E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). 2009. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

BALDEÓN, X. Actividad insecticida de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Tagetes ternifolia* y *Tagetes zipaquirensis* sobre *Premnotrypes vorax*. 2011. Tesis de grado obtención de título Bioquímico Farmacéutico. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y farmacia. Ecuador. Escuela superior politécnica de Chimborazo. 112.

BALTAZAR, I.; FLANDES, C. Actividad insecticida de extractos del helecho pesma (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) y el laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) sobre el tefritido (*Anastrepha ludens* (Loew)). 2011. Tesis de grado. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Agrícolas.

BARROS, L. Efecto neuroprotector del Sildenafil frente a la Hipoxia Química inducida por la Toxina mitocondrial Malonato. 2012. Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.

BELLO, S.; DÍAZ, E.; MALAGÓN, J.; ROMERO, M.; SALAZAR, V. Medición del impacto económico del dengue en Colombia: una aproximación a los costos médicos directos en el periodo 2000-2010. 2011. Simposio Enfermedades transmitidas por vectores. XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. *Biomédica*: 31(sup.3):3-315.

BERGILLOS, G. & RIVAS, A. Toxicología clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales. 2013. 1: 231-237.

BERNAL, H.Y.; GARCÍA, M.H.; QUEVEDO, S.F. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia: Estrategia nacional para la conservación de plantas. 2011. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. 230.

BERTONI, O. Insecticida natural para el control de *Musca doméstica* en base a aceites esenciales y sus componentes. 2013. Tesis de grado en Ciencias Agropecuarias.

BHATT, S.; GETHING, P.; BRADY, O.; MESSINA, J.; FARLOW, A.; MOYES, C.; DRAKE, J.; BROWNSTEIN, J.; HOEN, A.; SANKOH, O.; MYERS, M.; GEORGE, D.; JAENISCH, T.; WINT, W.; SIMMONS, C.; SCOTT, T.; FARRAR, J.; HAY, S. The global distribution and burden of dengue. 2013. *Nature*. 496 (7446): 504–507.

BROGDON, W., MCALLISTER, J. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles (Centro Nacional para el Control de

Enfermedades Infecciosas de Atlanta). 1998. Journal of American Mosquito Control Association. 14 (2): 159–164.

BUSVINE, J.; COKER, W. Resistance patterns in DDT resistant *Aedes aegypti*. 1958. Bull World Health Organ. 18:651-6.

CAMARA, Y. Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. 2005. Tesis doctoral en Biología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

CADAVID, J.; LONDOÑO, M.; MILÁN, S.; YEPES, H.; ALMANZA, R.; RÚA, G. Susceptibilidad al insecticida malation en *Aedes aegypti* de Medellín, Colombia. Nuevas alternativas de control del vector bajo la mirada de mecanismos de resistencia. 2011. Revista Salud Pública de Medellín. (5): 99-106.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. 2011. Washington, D.C.: OPS.

CHOI, W.; PARK, B.; LEE, Y.; JANG, D.; YOON, H.; LEE, S. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. 2006. Crop Protection. 25, 398–401.

DAVIS, E.; BOWEN, M. Sensory physiological basis attraction in mosquitoes. 1994. Journal American Mosquito Control Association. 10: 316-325.

DE LA ROSA, C., TORRES, C., CAMACHO, O., CALDERON, Z., HERRERA, E. & OSORIO, O. Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glucinemax* (Soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. 2012. Revista Colombiana de Ciencias de la Salud. 1 (1): 39-43.

DEMIRCI, B.; TSIKOLIAB, M.; BERNIERB, U.; AGRAMONTEB, A.; ALQASOUMIC, S.; AL-YAHYAC, M.; AL-REHAILYC, A.; YUSUFOGLUD, H.; DEMIRCI, F.; CAN BASERA, H.; KHANC, I.; TABANCA, N. *Phoenix dactylifera* L. spathe essential oil: Chemical composition and repellent activity against the yellow fever mosquito. 2013. *Acta Trópica* 128: 557– 560.

DEVILLERS, J.; LAGNEAU, C.; LATTES, A.; GARRIGUES, J.; CLÉMENTÉ, M.; YÉBAKIMA, A. *In silico* models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. 2014. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 25 (10): 805–835.

DIAS, C.; COUTINHO, D. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. 2014. *Parasitology Research* 113:565–592.

DÖRSAM, B; WU, C.; EFFERTH, T.; KAINA, B.; FAHRER, J. The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. 2015. *Archives Toxicology*. 89:797–805.

ELANGO, G.; RAHUMAN, A.; KAMARAJ, C.; BAGAVAN, A.; ZAHIR, A. Adult emergence inhibition and adulticidal activity of leaf crude extracts against Japanese encephalitis vector, *Culex tritaeniorhynchus*. *Journal of King Saud University*. 2012. *Science* 24: 73–80.

EL-GENDY, N.; SHAALAN, E. Oviposition deterrent activity of some volatile oils against the filaria mosquito vector *Culex pipiens*. 2012. *Journal of Entomology*. 9(6): 435-441.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. 1961. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.

ELUMALAI, K.; DHANASEKARAN, S.; ANANDAN, A.; KRISHNAPPA, K.; GOKULAKRISHNAN, J.; ELANGO, A. Larvicidal, ovicidal and pupicidal activity of *Eranthemum roseum* (vahl) r. br. against malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi* (liston) (Diptera: Culicidae). 2012. *International Journal of Current Agricultural Sciences* 2(7): 28- 33.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. 2001. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130: 325-337.

ESCOBAR, E.; LOPEZ, Y.; OSORIO, L.; GONZALEZ, M.; WOLFF, M. Manual para la vigilancia y control de vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla, leishmaniasis, enfermedad de chagas y encefalitis equina venezolana desde el nivel municipal. 1999. Dirección seccional de salud de Antioquia. 150 p.

ESPITIA, C. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra *Tribolium castaneum* herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). 2011. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Departamento de Toxicología.

FENG, R.; ISMAN, M. B. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. 1995. *Experientia*. 51: 831-833.

FINNEY, D. Probit analysis. 1971. Cambridge University Press, 3rd ed. 174.

FONSECA-GONZÁLEZ, I.; QUIÑONES, M.; LENHART, A.; BROGDON, WG. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. 2011. *Pest Management Sciences*. 67 (4):430-7.

FREITAS, F.; FREITAS, S.; LEMOS, G.; VIEIRA, I.; GRAVINA, G.; D.; LEMO, F. Comparative Larvicidal Activity of Essential Oils from Three Medicinal Plants against *Aedes aegypti* L. 2010. *Chemistry & biodiversity*. Vol. 7. 2801-2807

FOSTER, W.; WALKER, E. Mosquitoes (Culicidae). Chapter 12. *Medical and veterinary entomology*. 2002. Elsevier Science. 204-262.

FU, Z.; WANG, H.; HU, X.; SUN, Z.; HAN, C. The Pharmacological Properties of Salvia Essential Oils. 2013. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (07): 122-127.

FUNASA. Biología dos Vetores. 2001. Capítulo dos. 11-13p.

GARCÍA, A.; PÉREZ, E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). 2009. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

GARCÍA, C., MARTÍNEZ, A., ORTEGA, J., CASTRO, F. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. 2010. Revista Química Viva. 2(9): 86-96.

GIANNOULI, A.; KINTZIOS, S. Essential oils of *Salvia* spr: examples of intraspecific and seasonal variation 2000. Pags. 69-79. In: KINTZIOS S. (Ed.) 2000. Sage: The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers imprint. Department of Plant Physiology. Faculty of Agricultural Biotechnology. Agricultural University of Athens, Greece. ISBN 0-203-34348-4.

GOKULAKRISHNAN, J.; KUPPUSAMY, E.; SHANMUGAM, D.; APPAVU, A.; KALIYAMOORTHY, K. Pupicidal and repellent activities of *Pogostemon cablin* essential oil chemical compounds against medically important human vector mosquitoes. 2013. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 3(1): 26-31.

GOMES, G.; SOUZA, T.; FREIRE, G.; FARIAS, D.; PACHECO, A.; PONTES, N.; MORAIS, S.; URANO, A. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. 2013. Parasitology Research. 112:1953–1958

GONZÁLEZ, J. Interés farmacéutico de la *Salvia officinalis* y de la *Euphrasia officinalis*. 2009. Revista Cuadernos Tomas. 1:157-171.

GOVINDARAJAN, M.; MATHIVANAN, T.; ELUMALAI, K.; KRISHNPPA, K.; ANANDAN, A. Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). 2011. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1(1): 43-48.

GUHA, L.; SEENIVASAGAN, T.; BANDYOPADHYAY, P.; IQBAL, T.; SATHE, M.; SHARMA, P.; PARASHAR, B.; KAUSHIK, M. Oviposition and flight orientation response of *Aedes aegypti* to certain aromatic aryl hydrazono esters. 2012. Parasitology Research. 111:975–982.

HARBACH, R. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. 2007. Zootaxa. 1668:591–638.

HARRINGTON, L., SCOTT, T., LERDTHUSNEE, K., COLEMAN, R., COSTERO, A., CLARK, G., JONES, J., KITTHAWEE, S., KITTAYAPONG, P., SITHIPRASASNA, R., EDMAN, J. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. 2005. American Journal Tropical Medicine. 72(2): 209–220.

HEMINGWAY, J. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). 1998. WHO/CDC/CPC/MAL/98.6, World Health Organization, Geneva.

HERNÁNDEZ-AGERO, T.; CARRETERO-ACCAME, M.; VILLAR A. Salvia: Fitoquímica, farmacología y terapéutica. 2013. Farmacia profesional. 16 (7): <http://www.elsevierciencia.es> el 07/10/2013.

INSECTICIDE RESISTANCE WORKSHOP. Centers for Diseases Control. “Microplate assays”. 1998. Atlanta. GAS.

ISO 9909. Oil of Dalmatian Sage (*Salvia Officinalis* L.), American National Standards Institute (ANSI). 1997. New York, NY, USA.

JARAMILLO, G.; LOGAN, J.; LOZA-REYES, E.; STASHENKO, E.; MOORES, G. Repellents Inhibit P450 Enzymes in *Stegomyia (Aedes) aegypti*. 2012. PLoS ONE 7(11): e48698. doi:10.1371/journal.pone.0048698.

JANTOVÁ, S.; HUDEC, R.; SEKRETÁR, S.; KUČERÁK, J.; MELUŠOVÁ, M. *Salvia officinalis* L. extract and its new food antioxidant formulations induce apoptosis through mitochondrial/ caspase pathway in leukemia L1210 cells. 2014. Interdiscip Toxicol. 7(3): 146-153.

JUCKETT, G. Arthropod Bites. 2013. American Family Physician. 88(12):841847.

KANG, S.; KIM, K.; SEO, D.; NOH, D.; YANG, J.; YOON, C.; KIM, G. Comparative Repellency of Essential Oils against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). 2009. Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry. 52(4): 353-359.

KINTZIOS, S. (Ed.). Sage: The Genus *Salvia*. 2000. Harwood Academic Publishers imprint. Department of Plant Physiology. Faculty of Agricultural Biotechnology. Agricultural University of Athens, Greece. ISBN 0-203-34348-4.

KISHORE, N.; MISHRA, B.; TIWARI, V.; TRIPATHI, V. A review on natural products with mosquitosidal potentials. 2011. Capitol 11. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry.335-365. ISBN: 978-81-308-0448-4.

KOUL,O., WALIA, S., DHALIWAL, S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. 2008. Biopesticides International. 4(1): 63–84.

KUMAR, A.; MALIK, F.; BHUSHAN, S.; SETHI, V.; SHAHI, S.; KAUR, J.; TANEJA, S.; QAZI, G.; SINGH, J. An essential oil and its major constituent isointermedeol induceapoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. 2008. Chemico-Biological Interactions. 171: 332–347.

KRAMER, L.W. & MULLA, S.M. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex* mosquito to organic infusions. 1979. Environment Entomology. 8: 1111-1117.

LEYVA, M.; MARQUETTI, M.; TACORONTE, J.; SCULL, R.; TIOMNO, O.; MESA, A.; MONTADA, A. Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). 2009. Revista Biomedica. 20:5-13.

LEYVA, M.; TIOMNO, O.; TACORONTE, J.; MARQUETTI, M.; MONTADA, D. Essential plant oils and insecticidal activity in *Culex quinquefasciatus*. 2012a. En: Insecticides – Pest Engineering. Dr. PERVEEN, F. (Ed.). Available from: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-pest-engineering/essential-plnat-oils-and-insecticidl-activity-in-culex-quinquefasciatus>.

LEYVA, M., CASTEX, M., MONTADA, D., QUINTANA, F., LEZCANO, D., MARQUETTI, M., COMPANION, A., ANAYA, J. & GONZALEZ, I. Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en mosquitos. 2012b. Anales de Biología. 34: 49-58.

LICASTRO, S., MASUH, H., SECCACINI, S., HARBURGUER, L., LUCIA A., Z. Innovación en herramientas de control del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), transmisor del dengue en Argentina. 2010. Ciencia e investigación. 60(4): 49-57.

LIMA-CASTELANI, A.; CERON, C.; BICUDO, H. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) 2004. Biochemical Genetics. 42: 69-84.

LIMA, N.; DE MOURA, S.; NAPOLEÃO, T.; NOVAIS, G.; BARROSO, L.; DO AMARAL, D.; NAVARRO, F.; GUEDES, P. Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. 2012. PLoS ONE 7(9): e44840.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. 2001. Advanced Drug Delivery Reviews. 46(1-3): 3-26.

LOPEZ, L.; CASTAÑO, H.; MEJÍA, C. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. 2013. Actualidades biológicas. 35(98): 77-83.

LO PRESTI, A.; LAI A.; CELLA E.; ZEHENDER G.; CICCOSZI M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. 2014. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 925-932.

LUCAS, E.; ROMOSERI, W. The energetic costs of diving in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* pupae. 2001. Journal of the American Mosquito Control Association. 7(1):56-60.

LUCIA, A.; GONZALEZ, P.; SECCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. 2007. Journal of the American Mosquito Control Association. 23(3):299–303.

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; GONZALEZ, P.; MASUH, H. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. 2009. Bioresource Technology. 100: 6083–6087.

LUCIA, A.; JUAN, L.; ZERBA, E.; HARRAND, L.; MARCÓ, M.; MASUH, H. Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of Eucalyptus essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2012. Parasitology Research. 110:1675–1686.

LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. 2013. Parasitology Research. 112:4267–4272.

MAESTRE, R.; REY, G.; DE LAS SALAS, J.; VERGARA, C.; SANTACOLOMA, L.; GOENAGA, S.; CARRASQUILLA, M. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a Temefos en Atlántico-Colombia. 2009. Revista Colombiana de Entomología. 35(2): 202-205.

MAESTRE, R.; GÓMEZ, D. Dengue: epidemiología, políticas públicas y resistencia de vectores a insecticidas. 2013. Revista ciencias Biomédicas 4(2): 302-317.

MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. 2012. Parasitology Research.110:1801–1813

MATHEW, J.; THOPPIL J. Chemical composition and mosquito larvicidal activities of *Salvia* essential oils. 2011. Pharmaceutical Biology. 49 (5): 456-463.

MATHIVANAN, T.; GOVINDARAJANA. M.; ELUMALAI, K.; KRISHNAPPA, K.; ANANTHAN, A. Mosquito larvicidal and phytochemical properties of *Ervatamia coronária* Stapf. (Family: Apocynaceae). 2010. Journal of Vector Borne Disease (47): 178–180.

MAZZARI M. Revisión del estado actual de la resistencia en *Aedes aegypti* a insecticidas utilizados en salud pública. 2005. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. 35:90-5.

MÉNDEZ, S. Efeitos do composto mesoiônico MI-D e da imida cíclica S2.2 sobre mecanismos relacionados à indução de morte celular por via mitocondrial. 2009. Tese Doutor em Ciências-Bioquímica. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Brasil.

MENDEZ S., MARTINEZ C.; ROMÃO S., ECHEVARRIA A.; FERNANDES E.; MERLIN M.; RODRIGUES G.; GUNILLA E.; SUTER S.; MARTINELLI S. The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D:A relationship with its uncoupling effect and scavenging activity. 2009. Chemico-Biological Interactions. 179: 125–130.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em

Aedes aegypti. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2006. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 128.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y DE SALUD (Colombia). Manual de Procedimientos para la Gestión Integral de residuos Hospitalarios y Similares en Colombia. 2002. 92.

MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL (Colombia), INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Dengue. 2011. In: http://new.paho.org/col/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=1215&Itemid=.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. 2006. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz = Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. 128 p.

MORALES, J., GOMEZ, N., ROVIRA, J. & ABRAHAMS M. Actividad larvica de la toronja, *Citrus paradisi* (Rutaceae) sobre dos vectores del dengue. 2007. Revista peruana de biología. 14(2): 297-299.

MORALES, J., CASTILLO, J., LUNA, L. Aceite esencial del fruto del Noni (*Morinda citrifolia*: Rubiaceae) como larvica del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2010. Tecnociencia. 12 (1):195-233.

MORENS, D., FAUCI, A. Chikungunya at the Door — Déjà Vu All Over Again?. 2014. The New England Journal of Medicine. (371)10: 885-887.

NAVARRO, M.; MARQUES, F.; DUQUE, J. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. 2009. Revista Brasileira de Entomologia 53(1): 1-6.

NEDIC, N.; KOSTIC, M.; MARKOKIC, T.; PLAVSA, N.; MAKSIMOVIC, R. Tolerance of honey bees on winter savory (*Satureja montana*) and sage(*Salvia officinalis*) essential oils. 23 2013. International symposium New Technologies in Contemporary animal production. Servia. Junio 19-21.

NERIO, L., OLIVERO, J., STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. 2010. Bioresource Technology. 101 (2010): 372–378.

NETO, G. Efeito de extratos vegetais e oleos essenciais no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). 2009. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia Agrícola.

ORHAN,I.; KARTAL, M.; KAN, Y.; SENNER, B. Activity of Essential Oils and Individual Components Against Acetyl- and Butyrylcholinesterase. 2008. Zeitschrift für Naturforschung, 63c. 547-553.

OLIVEROS, A. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. 2008. Revista Química Viva. 1(7): 1-33.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Respuesta de la OPS al peligro de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. 2000. Revista Panamericana de Salud Publica. 7(4): 278-282.

ORTEGA, C. Alergia a la picadura de insectos. 2013. Pediatría Integral XVII(9): 628-636.

PAVELA, R. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). 2008. Parasitology Research. 102:555.

PAVELA, R.; KAFFKOVÁ, K.; KUMŠTA, M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha* L. and *Pulegium* Species against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). 2014. Plant Protection Science. 50 (1): 36–42.

PENICHE, A. La quimioinformática, una herramienta eficiente para desarrollar los medicamentos del futuro. 2011. Revista Teoría y Praxis Investigativa. 6 (1): 77-86.

PÉREZ, N.; JIMÉNEZ, E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. 2011. Biotecnología Vegetal. 11(4): 195 – 211.

PHASOMKUSOLSIL, S., SOONWERA, M. Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). 2011. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine: S113-S118.

PHASOMKUSOLSIL, S.; SOONWERA, M. The effects of herbal essential oils on the oviposition deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). 2012. Tropical Biomedicine 29(1): 138–150.

PHASOMKUSOLSIL, S.; SOONWERA, M. Efficacy of Thai herbal essential oils against three immature stages of *Aedes aegypti* (Linn), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say) Topclass. 2013 Journal of Herbal Medicine. 2(2): 25-35.

PIEROZAN, M.; PAULETI, G.; ROTA, L.; DOS SANTOS, A.; LERIN, L.; DI LUCCIO, M.; MOSSI, A.; ATTI-SERAFINI, L.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, J. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. 2009. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Campinas, 29, 764-770.

PONNUSAMY, L.; XU, N.; BÖRÖCZKY, K.; WESSON, D.; ABU, L.; SCHAL C.; APPERSON, C. Oviposition Responses of the Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to Experimental Plant Infusions in Laboratory Bioassays. 2010. Journal of Chemical Ecology. 36:709–719.

POPA, J.; CASTILLO, R.; PÉREZ, M.; FIGUEREDO, D.; MONTADA, D. Metamorfosis y emergencia de *Aedes aegypti* fuera del medio acuático y nuevo reporte de importancia entomológica y epidemiológica en Santiago de Cuba. 2011. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 49(2):173-182.

PORTE, A.; GODOY, R.; MAIA-PORTE, L. Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). 2013. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas. 15(3): 438-441.

PORRES-MARTÍNEZ M., CARRETERO M., GÓMEZ-SERRANILLOS M. Pharmacological activity of *Salvia lavandulifolia* and chemical components of its essential oil. A review. 2013. LAZAROA. 34: 237-254. 2013

PHUKERD, U.; SOONWERA, M.; WONGNET, O. Repellent activity of essential oils from rutaceae plants against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). 2013. Journal of Agricultural Technology. 9(6):1585-1594.

RAAL, A.; ORAVZ, A.; ARAKY, E. Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from Various European countries. 2007. Natural Product Research. 21 (5): 406-411.

RAINA, A.; NEGI, K.; DUTTA, M. Variability in essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown under North Western Himalayan Region of India. 2013. Journal of Medicinal Plants Research. 7(11): 683-688.

RAMAR, R.; PAULRAJ, M.; IGNACIMUTHU, S. Screening of pupicidal activity of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say Peak. 2013. Journal of Medicinal Plant Research. 1 (2): 9-12.

RAMIREZ, R., MORA, F., AVILA, J., ROJAS, L., USUBILLAGA, A., SEGNINI, S. & CARMONA, J. Composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Annona*

cherimola Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). 2001. Revista de Farmacología y Farmacia. 53(2):2-6.

RAMOS, A.; AZQUETA, A.; PEREIRA, C.; COLLINS, A. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. 2010. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (58): 7465–7471.

REINERT, J.F.; HARBACH, R.E.; KITCHING, I.J. Phylogeny and classification of *Aedini* (Diptera: Culicidae) based on morphological characters of all life stages. 2009. Zoological Journal of the Linnean Society. 142, 289–368.

REVUELTA, L. Análisis comparativo de la expresión e interferencia génica de dos acetilcolinesterasas en *Blattella germanica* (L) (Dyctioptera, Blattellidae) y en *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae). 2010. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 198.

REY, J.; RODRÍGUEZ, L. Enfermedades de Transmisión Vectorial en Santander. Sala de Situación. 2005. Boletín 01-03.16-27.

REZENDE, G.; MARTINS, A.; GENTILE, C.; FARNESI, L.; PELAJO, M.; PEIXOTO, A.; VALLE, D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. 2008. BMC Developmental Biology. 8(1):182- 196.

RINGUELET, J.; VIÑA, S. Capítulo 1: Introducción a los productos naturales vegetales. 2013. En: RINGUELET, J.; VIÑA, S. (Eds.) 2013. Productos naturales vegetales. La Plata. Universidad Nacional de La Plata. Primera edición. 258.

RUEDA, L. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. 2008. Hydrobiologia. 595:477– 487.

RODRIGUEZ, R. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegyptien* las Américas. 2002. Revista Cubana de Medicina Tropical. 54(3):189-201.

RODRÍGUEZ, G.; VELANDIA, M.; BOSHELL, J. Fiebre amarilla, la enfermedad y su control. 2003. Bogotá: Instituto Nacional de Salud. 60 p.

RODRÍGUEZ, H.; DE LA HOZ, F. Dengue and Dengue Vector Behaviour in Cáqueza, Colombia, 2004. 2005. Revista de Salud Pública. 7 (1): 1-16.

ROJAS, W.; GÓNZÁLEZ, J.; AMUD, M.; QUIÑONES, M.; VÉLEZ, I. Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* del municipio de Barrancabermeja, Santander a los insecticidas malatión, fenitrotión, temefos, lambdacialotrina, deltametrina, permetrina, propoxur y DDT. 2003. 2003. Biomédica. 23(Supl.1):35-6.

ROJAS, E.; GARCÍA, R.; MORALES, A. Actividad de extractos vegetales sobre larvas de insectos de importancia en entomología médica. 2010. Tesis. Facultad de ciencias químicas y farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala.

ROJAS, D. Contribución de la vacuna al programa de prevención y control de dengue. Simposio Enfermedades transmitidas por vectores. 2011. XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Biomédica 31(Supl.3):3-315.

ROMERO, L. Informe final del evento dengue. 2012. INS. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud pública.

ROSSI, G.; MARILUIS, J.; SCHAK, J.; SPINELLI, G. Dípteros vectores (Culicidae y Calliphoridae) de la provincia de Buenos Aires. 2002. COBIOBO: Comisión de Biodiversidad Bonaerense. Programa para el estudio y uso Sustentable de la Biota Austral. Secretaria de Política Ambiental. Impresiones PublicArt. La Plata, Argentina. 48.

RUSSO, A., CARDILE, V., GRAZIANO, A., FORMISANO, C., RIGANO, D., CANZONERI, M., BRUNO, M., SENATORE, F. Comparison of essential oil components and in vitro anticancer activity in wild and cultivated *Salvia verbenaca*. 2014. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. 1-14.

RYAN, M.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. 1988. Journal of Chemical Ecology. 14 (10).

SANCHEZ, E.; PEREZ, A; CHAVEZ, D.; RODRIGUEZ, C. Caracterización farmacognóstica de *Salvia officinalis* L. 2005. Revista Cubana Plantas Medicinales. 10 (1).

SANTACOLOMA, L.; CHAVES, B.; BROCHERO, H. Suceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lamdbacilotrina en Colombia. 2010. Revista Panamerica de Salud Publica 27(1): 66-73.

SANTANA, O.; CABRERA, R.; GIMÉNEZ, C.; GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ, R.; DE LOS MOZOS, M.; RODRÍGUEZ, M.; LASERNA, I.; USANO, J.; HERRAIZ, D. Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). 2012. Grasas y aceites, 63 (2): 214-222.

SEPULVEDA-JIMENEZ G., PORTA-DUCOING H., ROCHA-SOSA M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. 2003. Revista Mexicana de quimica. 21:355-363.

SIMMONS, C.; FARRAR, J.; VINH, N.; WILLS, B. Current Concepts Dengue. 2012. The New England Journal of Medicine. 366:1423-32.

SINGH, B.; SINGH, P.; MOHANTY, M. Toxicity of a plant based mosquito repellent/killer. 2012. Interdisciplinary Toxicology. 5(4): 184–191.

SIVAGNANAME, N.; KALYANASUNDARAM, M. Laboratory Evaluation of Methanolic Extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against Immature Stages of Mosquitoes

and Non-*target* Organisms. 2004. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 99(1): 115-118.

SOONWERA, M.; PHASOMKUSOLSIL, S. Mosquito repellent from Thai essential oils against dengue fever mosquito (*Aedes aegypti* (L.)) and filarial mosquito vector (*Culex quinquefasciatus* (Say)). 2014. African Journal of Microbiology Research. 8(17): 1819-1824.

SOUZA, T.; FARIAS, D.; SOARES, B.; VIANA, M.; LIMA, G.; MACHADO, L.; MORAIS, S.; CARVALHO, A. Toxicity of brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Non *target* animals. 2011. Journal of Medical Entomology. 48(4):846-851.

STEFANAZZI, S.; GUTIERREZ, T.; STADLER, T.; BONINI, N.; FERRERO, A. Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes ternoflora* Kunth (Asteraceae) en *Tribolium castaneum* Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). 2006. Boletín Sanidad Vegetal y plagas. 32: 439-447.

STEFANAZZI, N. Essential oils, an alternative tool for integrated handling of stored-grain pests. 2010. Universidad Nacional del Sur [Argentina]. Tesis doctoral en Biología.

STEFANIDIS, G., NAVARRETE, A., STURM, G., STANKIEWICZ, A. A helicopter view of microwave application to chemical processes: reactions, separations, and equipment concepts. 2014. Reviews in chemical engineering. 30(3): 233–259.

SUAREZ, M.; GONZALEZ, R.; MORALES, R. Temephos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. 45th Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, Maryland. 1996. Supplement to the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 55(2): 257.

SU, T. & MULLA, M.S. 1998. Ovicidal activity of neem products (Azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of American Mosquito Control Association. 14: 204 - 209.

SUMAN, D., WANG Y., BILGRAMI A. & GAUGLER R. Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. 2013. Acta Tropica 128:103– 109.

SUKUMAR, K.; PERICH.M.;BOOBAR,L. Botanical derivatives in mosquito control: a review. 1991. Journal Mosquito Control Association. 7: 210-237.

TENNYSON, S.; RAVINDRAN, J.; ARIVOLI, S. Bioefficacy of botanical insecticides against the dengue and chikungunya vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). 2012. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. S1842-S18.

TENNYSON, S.; ARUL, D.; JEYASUNDAR, D.; CHALIEU, K. Larvicidal Efficacy of Plant Oils Against the Dengue Vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). 2013. Middle-East Journal of Scientific Research. 13 (1): 64-68.

ULUBELEN, A. Chemical constituents. Terpenoids in the genus *Salvia*. 2000. Pages 55-68. In: KINTZIOS, S. (Ed.) 2000. Sage: The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers imprint. Department of Plant Physiology. Faculty of Agricultural Biotechnology. Agricultural University of Athens, Greece.

VALARMATHY, D.; GOVINDARAJU, M.; ELUMALAI, K. Studies on ovicidal activity of plant essential oil formulation against the eggs of important vector mosquitoes, *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.) at laboratory condition. 2011. International Journal of Current Research. 33 (6): 378-381.

VARGAS, M. An update on published literature (period 1992-2010) and botanical categories on plant essential oils with effects on mosquitoes (Diptera: Culicidae). 2012. Boletín de malariología y salud ambiental. LII (2): 143.

VAŠKO, L.; VAŠKOVÁ, J.; FEJERČÁKOVÁ, A.; MOJŽIŠOVÁ, G.; PORÁČOVÁ, J. Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana* In Vitro. 2014. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (50):614–622.

VASQUEZ,A.; PEREZ,L.; DIAZ, R. Biomoleculas con actividad insecticida: Una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. 2007. Ciencia y tecnología alimentaria. (5)4: 306-313.

VIVANCO, J.; COSIO, E.; LOYOLA, V.; FLORES, H. 2005. Investigación y Ciencia. 68-75.

VARGAS, M. Una actualización de las publicaciones (período 1992-2010) y las categorías botánicas de aceites esenciales de plantas con efectos sobre los mosquitos (Diptera: Culicidae). 2012. Boletín de malariología y salud ambiental. Volumen LII (2).

WEAVER, S., LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. 2015. The New England Journal of Medicine (372) 13: 1231-1239.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2013. Second WHO report on neglected tropical diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 138.

YAÑEZ, X., PEREZ, O. & MEZA, H. Actividad del aceite esencial foliar de *Eucalyptus globulus* contra *Aedes aegypti* Linnaeus. 2010. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 8 (1).

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. 2011. Journal of Saudi Chemical Society.

ANEXOS

Anexo A. CONSIDERACIONES ETICAS

1.1. NIVEL DE RIESGO DEL PROYECTO

De acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y en la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993, este proyecto de grado se considera con un nivel de riesgo mínimo. Considerando que si bien es cierto que a lo largo del proyecto se evaluará la bioactividad del aceite esencial de *Salvia officinalis* en insectos y no en mamíferos, el bioensayo denominado “Actividad repelencia a la picada de los mosquitos” (Descrito en el numeral 6.4.2) requiere de la participación de voluntarios humanos. Teniendo en cuenta que la aplicación tópica de los tratamientos (aceite esencial y cetona) se realizará en una pequeña área del antebrazo, y que la acción de los mismos se ve influenciada por aspectos fisiológicos propios de cada individuo (sudoración, nivel de CO₂, posible respuesta alérgica a los tratamientos), aun cuando no se realicen exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, se debe considerar que el fin último de este tipo de prueba conllevaría a largo plazo a una formulación repelente, la cual puede ser considerada como un medicamento de uso externo común.

Debido a que se expondrán los antebrazos del voluntario al aceite esencial y a la eventual picadura por parte de hembras de *S. aegypti*, se adoptará un protocolo para la aplicación de la prueba, contemplando los requisitos necesarios en un consentimiento informado (Anexo C). En dicho protocolo, se explicará a los voluntarios los objetivos y justificación de la investigación, el procedimiento a realizar y las potenciales molestias o riesgos esperados. En este último caso, se explicará al voluntario las posibles consecuencias a la exposición a los tratamientos (aceite esencial y cetona) debido a una posible respuesta alérgica a los componentes en la zona expuesta, o en reacción a la picadura de los mosquitos.

Antes de dar inicio a la prueba, se realizará una limpieza a la zona del antebrazo a exponer, con el fin de evitar una eventual reacción química de otros componentes (cremas corporales, colonias) con los tratamientos. Teniendo en cuenta que la cetona

(tratamiento control) es de origen natural y existente en una gran variedad de productos de uso tópico, los únicos efectos no deseados que se pudieran presentar consisten en dermatitis causadas por la reacción con otras sustancias aplicadas previamente. De esta manera, una vez aplicados los tratamientos sobre la piel, se dará un tiempo de espera, no solo para permitir que el líquido se evapore, sino además para observar potenciales reacciones. Dada la eventualidad de presentarse cualquier reacción alérgica antes de iniciar la prueba, la misma se suspenderá de manera inmediata y se lavará con abundante agua corriente el área expuesta.

En relación a una eventual reacción alérgica grave a la picadura de los mosquitos, debe recordarse que las reacciones por picaduras por individuos del Orden Diptera (moscas, mosquitos) son más leves que las producidas por picaduras de individuos del orden Hymenoptera (abejas, avispas y hormigas) y no suelen corresponder a una reacción alérgica mediada por inmunoglobulinas E (IgE) específicas (Ortega, 2013). Esto se debe principalmente a que estas picaduras no son venenosas, y aunque producen irritación local, las escasas reacciones alérgicas se desencadenan debido a la saliva y a las sustancias anticoagulantes que inyectan (Ortega, 2013).

Las picaduras de mosquito suelen producir una reacción local consistente en una roncha o pápula de color rosa con un punto central, que pica, la cual puede persistir de uno a dos días. Estas ronchas o pápulas son de color rosa y a menudo con un punto central (Ortega, 2013; Juckett, 2013). El voluntario deberá evitar el rascado, ya que puede exacerbar la picazón, erosionar la piel y provocar una infección. Aunque la sensibilidad a la picadura varía ampliamente, algunas personas pueden experimentar una reacción grave prolongada asociada a una hipersensibilidad a la saliva del mosquito (Ortega, 2013; Juckett, 2013).

Debido a que las lesiones se autolimitan en horas, el tratamiento para estas picaduras suele ser sintomático (Bergillos & Rivas, 2013). De esta manera, las medidas a emplear en un primer momento por parte de los voluntarios consisten en un lavado de la zona con agua corriente, elevar el brazo y aplicar una compresa fría para reducir la inflamación y el dolor. Para evitar infecciones secundarias, se limpiará el área afectada en el momento en

que se termine la prueba, bien sea con alcohol antiséptico, o con agua y jabón. Para aliviar el prurito, Ortega (2013) recomienda consumir un antihistamínico vía oral, o incluso un corticoide tópico, además del uso de productos a base de amoníaco, ya que disminuyen rápidamente el prurito y a irritación de la piel.

El síndrome de Skeeter constituye la reacción alérgica más grave. Se caracteriza por una reacción de hipersensibilidad intensa relacionada con alérgenos en la saliva de los mosquitos, que puede producirse desde unos pocos minutos a una o dos horas después de la picadura. Se caracteriza por hinchazón, dolor, enrojecimiento o eritema, quemazón/dolor y fiebre. Aun cuando los síntomas desaparecen gradualmente en los siguientes 3 a 10 días, los antihistamínicos y prednisona se usan para tratar esta condición (Juckett, 2013; Bergillos & Rivas, 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, durante la ejecución de la prueba el investigador estará atento a cualquier signo o síntoma de malestar por parte del voluntario. Si llegase a presentar cualquier reacción alérgica grave, será remitido a la Unidad de Enfermería ubicada en la Sede UIS Guatiguará (Ubicada a dos minutos del lugar donde se realizará la prueba), la cual, cumpliendo con el Plan de Contingencia descrito en el PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL- PGIRS, brindará los cuidados y tratamiento a que diera lugar.

1.2. USO DE ANIMALES

En relación al uso de animales, con el fin de suministrar a las hembras de *S. aegypti* alimentación sanguínea para la obtención de huevos, se emplearan ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de raza Winstar WI IOPS AF/Han, facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

1.3. MANEJO DE SUSTANCIAS

El Parque Tecnológico Guatiguará genera residuos en cantidades y características de interés sanitario y ambiental (biológicos, químicos y desechos sólidos, entre otros) que

merecen un manejo, clasificación, almacenamiento y una disposición final adecuada. Para la gestión integral de estos residuos, se tienen en cuenta los lineamientos descritos en la normatividad legal vigente, como la Ley novena de 1979, Código Sanitario Nacional; el Decreto 4741 del 2005 por el cual se reglamenta el manejo de residuos peligrosos en Colombia y el Decreto 351 de febrero de 2014, el cual armoniza y actualiza ambiental y sanitariamente la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades en Colombia. Es así como en el año 2008 se formuló y elaboró el PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS – PGIRS de la Sede Guatiguará, el cual fue viabilizado por la Coordinación de la Sede y por la Secretaría Departamental de Santander.

De esta manera, en los laboratorios donde se encuentra el insectario y el lugar de experimentación del CINTROP, se generan residuos como Infecciosos o de Riesgo Biológico, además de residuos Químicos (Ministerio de Medio Ambiente y Salud, 2002), discriminados de la siguiente manera:

Biosanitarios:

Son todos aquellos elementos o instrumentos utilizados durante la ejecución de los procedimientos asistenciales que tienen contacto con materia orgánica, sangre o fluidos corporales del paciente humano o animal tales como: gasas, apósitos, aplicadores, algodones, drenes, vendajes, mechas, guantes, bolsas para transfusiones sanguíneas, catéteres, sondas, material de laboratorio como tubos capilares y de ensayo, medios de cultivo, láminas porta objetos y cubre objetos, laminillas, sistemas cerrados y sellados de drenajes, ropas desechables, toallas higiénicas, pañales o cualquier otro elemento desechable.

Cortopunzantes:

Son aquellos que por sus características punzantes o cortantes pueden dar origen a un accidente percutáneo infeccioso. Dentro de éstos se encuentran: limas, lancetas, cuchillas, agujas, restos de ampollitas, pipetas, láminas de bisturí o vidrio, y cualquier otro elemento que por sus características corto-punzantes pueda lesionar y ocasionar un riesgo infeccioso.

Reactivos:

Son aquellos que por sí solos y en condiciones normales, al mezclarse o al entrar en contacto con otros elementos, compuestos, sustancias o residuos, generan gases, vapores, humos tóxicos, explosión o reaccionan térmicamente colocando en riesgo la salud humana o el medio ambiente. Incluyen líquidos de revelado y fijado, de laboratorios, medios de contraste, reactivos de diagnóstico *in vitro* y de bancos de sangre.

El manejo adecuado del material biosanitario sigue todos los procedimientos de la normativa ambiental, sanitaria y ocupacional de residuos potencialmente peligrosos. Los desechos corto-punzantes y reactivos, son separados y descartados en recipientes rotulados de acuerdo a la normativa del Parque tecnológico de Guatiguará. La gestión externa de los residuos generados en el Parque tecnológico de Guatiguará está contratada con la empresa DESCONT S.A ESP, la cual se encuentra debidamente acreditada para la actividad descrita bajo Licencia Ambiental No. 426 del 21 de Mayo de 1999 otorgada por la Corporación Autónoma Regional para la defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB).

Por último, durante la manipulación del aceite esencial y preparación de las pruebas, el ser humano utilizara todos los implementos de protección personal como guantes de látex, tapa bocas, batas anti-fluido, máscaras de seguridad y campanas de extracción de gases. También, como política de todos los laboratorios ubicados en la sede Guatiguará, se hace un seguimiento estricto para que se mantengan y cumplan las normas de bioseguridad en el lugar de trabajo.

1.3.1. Manejo de residuos generados en el proyecto

De acuerdo al PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS – PGIRS de la Sede Guatiguará, el manejo de los residuos generados a lo largo del proyecto seguirá tres fases: Segregación, Tratamiento y Disposición Final.

- Fase de Segregación

La fase de segregación contempla la plena identificación del tipo de residuo generado, así como el tipo de contenedor, recipiente o envase para el almacenamiento de residuos

peligrosos dependiendo del tipo de residuo. Para biosanitarios se emplean bolsas de polietileno de alta densidad de color rojo, para cortopunzantes se emplearan recipientes herméticos con tapa de color rojo. Estas bolsas y recipientes se deben llenar hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad, cerrándose adecuadamente antes de ser transportados al sitio de almacenamiento temporal y no se deben abrir o vaciar. Las bolsas para recolección de residuos deben estar ubicadas dentro de una caneca plástica de color rojo sin aristas y con tapa fija. Los residuos cortopunzantes antes de su disposición final deben ser inactivados añadiendo una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, por 30 minutos y luego se descarta el líquido resultante por el desagüe con abundante agua. Las agujas se deben introducir en el recipiente sin reenfundar; las fundas de protección se arrojan en los recipientes de residuos ordinarios siempre y cuando no estén contaminadas de sangre o fluidos corporales. Después del proceso de desinfección, se sella el recipiente y se introduce en una bolsa roja rotulada como material cortopunzante.

Con los residuos de tipo químico se deben usar contenedores de polietileno de alta densidad, el cual es resistente a la mayoría de sustancias químicas. El volumen del recipiente depende de la cantidad de residuo que se genere. Se recomienda utilizar volúmenes pequeños no mayores a 4 litros, para facilitar el transporte de los mismos. El envase debe estar en perfectas condiciones, es decir no debe presentar roturas o deformaciones. Los residuos líquidos se disponen en recipientes de boca angosta y los sólidos en recipientes de boca ancha. Se debe dejar aproximadamente el 10-20 % del contenedor o envase sin llenar, especialmente si las sustancias que conforman el residuo tienen una presión de vapor alta. Sólo residuos químicamente compatibles pueden ser acumulados en cada recipiente, el cual debe estar correctamente etiquetado.

Todos los envases o contenedores donde se almacenen residuos peligrosos deben tener la etiqueta que permita identificarlos y reconocer la naturaleza del peligro que representan y de esta manera alertar a las personas involucradas en su manipulación. Por ello, en las Figuras 8 y 9 se ilustran las etiquetas empleadas para la identificación de residuos, teniendo en cuenta la clasificación de los residuos peligrosos establecida en el decreto 2676 de 2000.




MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS
SEDE GUATIGUARÁ - UIS
RESIDUOS PELIGROSOS DE TIPO INFECCIOSO O DE RIESGO BIOLÓGICO
MANEJARSE CON PRECAUCIÓN


GENERADOR: FECHA DE INICIO DE RECOLECCIÓN:
 RESPONSABLE: FECHA DE ENTREGA DEL RESIDUO:

| DESCRIPCIÓN DEL RESIDUO | CLASIFICACIÓN GENERAL | | | |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|---------------|--------|
| | BIOSEGURIDAD | MANEJO DE RESIDUOS | CONTAMINANTES | ANIMAL |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

GENERADO EN ACTIVIDADES DE: DOCENCIA INVESTIGACIÓN EXTENSIÓN

Figura 8. Etiqueta Residuos Infecciosos, Riesgo Biológico y biosanitarios.


MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS
SEDE GUATIGUARÁ - UIS
RESIDUOS PELIGROSOS DE TIPO QUÍMICO
MANEJARSE CON PRECAUCIÓN


GENERADOR: FECHA DE INICIO DE RECOLECCIÓN:
 RESPONSABLE: FECHA DE ENTREGA DEL RESIDUO:

| COMPOSICIÓN DEL RESIDUO (Nombre de las Sustancias) | % | CLASIFICACIÓN SEGÚN SU PELIGROSIDAD | | | | | | | CLASIFICACIÓN GENERAL | | | |
|---|---|-------------------------------------|-----------|----------|--------|------------|-------------|----------|-----------------------|---------|------------------------|----------------|
| | | CORROSIVO | EXPLOSIVO | REACTIVO | TÓXICO | INFLAMABLE | RADIOACTIVO | FARMACOS | CITOTÓXICOS | METALES | CONTENEDOR PRESURIZADO | ACEITES USADOS |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |

GENERADO EN ACTIVIDADES DE: DOCENCIA INVESTIGACIÓN EXTENSIÓN

Figura 9. Etiqueta Residuos Químicos.

- Fase de Tratamiento

El tratamiento hace referencia a los procesos aplicables a los residuos con el fin de reducir o anular las características que le confieren peligrosidad para la salud humana y el ambiente, así como también para facilitar el transporte, almacenamiento, disposición final y aprovechamiento de las sustancias generadas. En el caso de los residuos generados a

lo largo del desarrollo del proyecto, no se les realiza ningún tipo de proceso o procedimiento de tratamiento.

- Disposición final

La disposición final es el proceso de aislar y confinar los residuos o desechos peligrosos, en especial los no aprovechables, en lugares especialmente seleccionados, diseñados y debidamente autorizados para evitar, la contaminación y los daños o riesgos a la salud humana y al medio ambiente. Dicha disposición será realizada mediante un gestor externo, en nuestro caso con la empresa DESCONT S.A ESP.

1.4. PRINCIPIOS ÉTICOS EN LA INVESTIGACIÓN

- Principio de Beneficencia

Se aplicará cuando durante la lectura del consentimiento informado, se da a conocer en relevancia la necesidad de realizar la prueba, pues se pretende la implementación a largo plazo de alternativas viables y seguras para el control de mosquitos transmisores de enfermedades de importancia en salud pública.

- Principio de no-maleficencia

A lo largo de la ejecución del proyecto no se realizará ningún procedimiento que pueda ser causal de daño en los voluntarios humanos empleados para la prueba “Actividad repelencia a la picada de los mosquitos”. Si el voluntario llega a presentar algún tipo de reacción alérgica a las sustancias empleadas, la prueba se suspenderá de inmediato, y si presenta una reacción a la picadura de los mosquitos, recibirá la atención medica correspondiente.

- Principio de Autonomía

Los voluntarios humanos conocerán de antemano el procedimiento a seguir mediante el protocolo establecido en el consentimiento informado, además de las implicaciones y posibles riesgos que se pudieran generar. Estarán en su libre derecho de negarse a participar en la misma.

- Principio de Justicia

Los voluntarios se presentaran sin ningún tipo de coerción o discriminación, tratando a los mismos con igual consideración y respeto. Para ello, se realizó una convocatoria pública para la selección de los participantes que no tuvieran ningún tipo de antecedente frente a reacciones alérgicas relacionadas con la aplicación de sustancias tóxicas y picaduras de mosquitos. Dicha convocatoria pública se dio a conocer mediante avisos informativos en las instalaciones de la sede Guatiguará, ubicándolos en lugares estratégicos (Portería, cafetería, puertas de ingreso) (Figura 10).

En el momento de la realización de la prueba, cada voluntario recibió el mismo trato y le fueron leídos los mismos lineamientos descritos en el consentimiento informado. Adicionalmente, si alguno de ellos hubiera presentado alguna reacción alérgica, todos recibirían el mismo tratamiento a que diera lugar.

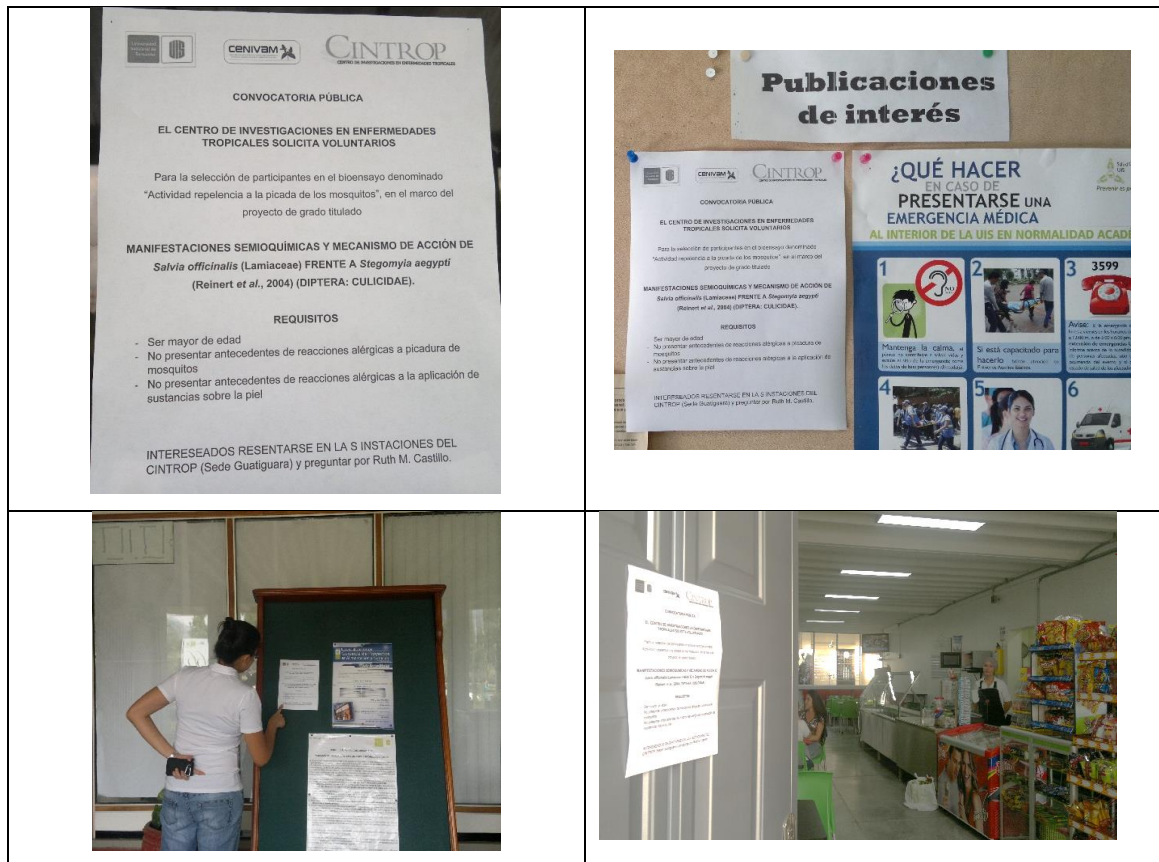


Figura 10. Ubicación de los avisos informativos de la Convocatoria pública para la selección de participantes en el bioensayo

Anexo B. Metodología de extracción de ADN de *Aedes aegypti*. (Kit de extracción UltraClean® Tissue & Cells)

El protocolo puede ser hecho en pool o de forma individual (depende de los objetivos de la extracción). Muestras con pesos mayores a 25 mg pueden generar demasiada viscosidad, lo cual dificulta el paso del homogeneizado a través de los filtros del Kit. En este sentido, si se trabaja en pool, es recomendado pesar las muestra para que no supere la cantidad sugerido por el fabricante para el método de extracción.

-Preparación del homogenizado

Las larvas fueron homogenizadas en pool, en 700 μ L de la solución TD1 hasta que el material estuvo homogéneamente diluido. Este contenido se transfirió a tubos eppendorf de 2mL.

-Digestión con Proteinasa K

A cada tubo *ependorf* se le adiciono 20 μ L de Proteinasa K, y agitados en vortex entre 1-5 min. Posteriormente, fueron llevados a incubación a 60 °C por 30 minutos.

-Filtrado del ADN

Los tubos fueron centrifugue por 1 minuto a temperatura ambiente a 10.000 rpm. El contenido fue transferido al filtro del kit (Spin Filter – proporcionado en el Kit de extracción). Se centrifugo a 10.000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente para descartar el sobrenadante.

- Lavado del ADN

Al Spin Filter se le adicionaron 400 μ L de la solución TD2 y se centrifugo a 10.000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente para descartar el sobrenadante. Se centrifugo 10.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente para remover residuos de la solución TD2.

- Elusión del ADN

Se extrajo el Spin Filter y se colocó en un tubo *ependorf* de 2 mL (proporcionado por el Kit), para adicionarle 50 μ L de la solución TD3 en el centro de la membrana del filtro. Se centrifugo 10.000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente. Por último, se descartó el Spin Filter ya que el ADN se concentró en el tubo *ependorf* de 2 mL.

Nota: Para obtener más ADN se puede adicionar 50 μ L de la solución TD3. El ADN puede almacenarse entre -20 °C y -80 °C.

Anexo C. Consentimiento Informado.

Universidad Industrial de Santander

UIS

ESCUELA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

Código del participante

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Reinert et al., 2004) (DIPTERA: CULICIDAE)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con base en los principios establecidos en la Resolución 008430 del 04 de octubre de 1993 por la cual se establecen las normas para la investigación en salud en Colombia, específicamente en el Artículo 15, en lo relacionado con el Consentimiento Informado, usted deberá conocer acerca de esta investigación antes de aceptar participar en ella si lo considera conveniente. Por favor lea con cuidado y haga las preguntas que desee hasta su total comprensión.

Recuerde que la participación es absolutamente voluntaria, de manera que lea atentamente la siguiente información

El experimento consiste en aplicar aceites esenciales extraídos de plantas en los antebrazos de voluntarios y ver si actúan como repelentes para mosquitos. El producto se aplica en uno de los antebrazos en una región de aproximadamente 2 x 2 cm, luego se deja secar durante unos minutos y se colocan unas jaulas especiales que contienen mosquitos libres de patógenos. Uno de los antebrazos será utilizado como tratamiento control, es decir que no se aplica ningún aceite esencial, solo alcohol o cetona. La prueba dura el tiempo en que el mosquito pique el área donde fue aplicado el aceite esencial. Si eventualmente el aceite tiene un periodo de protección mayor a 30 minutos, se le quitarán las jaulas con los mosquitos. De esta manera, el tiempo de exposición total al que se expone cada voluntario a la prueba es de 1 hora como tiempo máximo.

En muy raros casos, es posible que experimente lo siguiente:

1. Reacción alérgica a la picada del mosquito *Stegomyia aegypti* (cepa de laboratorio inocua)
2. Reacción alérgica por la aplicación del aceite esencial que se aplica en la piel para las pruebas de repelencia de mosquitos.

Usted tiene el derecho de hacer cualquier pregunta concerniente a los riesgos conocidos/potenciales de este estudio en cualquier momento. Durante la ejecución de la prueba el investigador estará atento a cualquier signo o síntoma de malestar por parte del voluntario. Si llegase a presentar cualquier reacción alérgica leve, se suspenderá la prueba de inmediato, se realizará un lavado de la zona con agua corriente, y se le solicitará elevar el brazo y aplicar una compresa fría para reducir la inflamación y el dolor. En el caso de una reacción alérgica grave, será remitido a la Unidad de Enfermería ubicada en la Sede UIS Guatiguará, donde se le brindarán los cuidados sintomáticos y tratamiento a que diera lugar.

Si tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como paciente de investigación, comuníquese con el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander, en horas hábiles al teléfono 6344000 ext 3208, o enviar correo electrónico a comitedetica@uis.edu.co

Universidad Industrial de Santander

UIS

Comité de Ética en Investigación Científica

aprobación 08-12 de mayo de 2015 vencimiento

□□□□□ Código del participante □□□□□

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Reinert et al., 2004) (DIPTERA: CULICIDAE)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Usted puede preguntar hasta su complacencia todo lo relacionado con el estudio y su participación en este.

Aunque decida no participar, se le recomienda que aplique las medidas para prevenir la multiplicación del mosquito desde su vivienda, ayudando así a controlar el virus del dengue en la zona:

Elimine todos los objetos inservibles que puedan acumular agua de lluvia (latas, botellas vacías, llantas, macetas). Mantenga los elementos útiles en desuso boca abajo (baldes, frascos, tachos). Vacíe todos los recipientes que contengan agua (tanques, barriles). Cambie el agua de floreros y bebederos de animales diariamente.

Se solicita su autorización para que las muestras y datos obtenidos en este estudio puedan ser utilizados en otros estudios y laboratorios, con previa aprobación del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander para realizar dichos estudios.

- ¿Acepta usted participar en este estudio voluntariamente? () Si () No
- Acepta que los datos y las muestras de este estudio puedan ser utilizados en estudios posteriores, previa aprobación de un comité de ética, si se requiere? () Si () No

La Resolución 008430/93 del Ministerio de Salud Nacional exige consignar el nombre del participante, su firma o huella digital, su identificación personal. Requiere también la forma de dos testigos con su nombre, dirección y fecha de la firma, y que indique su parentesco con el participante. El responsable de obtener el consentimiento informado debe formar y consignar sus datos de identificación personal, lugar y fecha de la obtención del consentimiento.

Con fecha de _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que le aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a su participación en la investigación, usted acepta participar en la investigación titulada:

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Reinert et al., 2004) (DIPTERA: CULICIDAE)



ESCUELA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

Código del participante

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Reinert et al., 2004) (DIPTERA: CULICIDAE)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

Cedula de ciudadanía: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma del testigo 1: _____

Cedula de ciudadanía: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Relación que guarda con el participante: _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma del testigo 2: _____

Cedula de ciudadanía: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Relación que guarda con el participante: _____

Doctor **Jonny Edward Duque Luna**

Director del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP)

Profesor de la Universidad Industrial de Santander

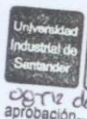
Facultad de Salud - Escuela de Medicina

Teléfono 6455693 - Celular: 3176578399

Email: jonedulu@uis.edu.co

Firma: _____ Fecha: _____

Contacto Comité de Ética: Para preguntas o aclaraciones acerca de los aspectos éticos de esta investigación puede comunicarse con el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander, en horas hábiles al teléfono: 6344000 Ext. 3208, o enviar correo electrónico a comitedetica@uis.edu.co



Comité de Ética
en Investigación
Científica
aprobación _____
vencimiento _____

aprobación _____

Anexo D. DIVULGACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del desarrollo de este trabajo de investigación, fueron presentados en eventos académicos de carácter nacional e internacional:

Ponente. Dilucidación del mecanismo de acción de la actividad insecticida de *Salvia officinalis* sobre *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) a nivel de DNA, AChE y mitocondrias. 42 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Realizado en Medellín, 21 al 23 de julio de 2015.

Ponente. Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). AMCA 81st Annual Meeting of mosquito. The American Mosquito Control Association. New Orleans, Louisiana, USA. Marzo 29 a Abril 02 de 2015.

Ponente. Manifestaciones semioquímicas de aceites esenciales en *Stegomyia aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Primer simposio Internacional en Biotecnología y Agroindustria. AGRO-BIOTECH Research Center. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 11 y 12 de diciembre de 2014.

Ponente. Manifestaciones semioquímicas y actividad enzimática de *Salvia officinalis* sobre *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae). 41 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, 15 al 18 de julio de 2014.

Expositor poster. Manifestaciones semioquímicas de aceites esenciales en *Stegomyia aegypti* L. (Diptera: Culicidae). 41 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, 15 al 18 de julio de 2014. Mejor Cartel del 41 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología.

En proceso de aceptación de publicación, en el Journal American Mosquito Control Association, se encuentra el artículo titulado:

Insecticide and repellent activity of essential oils on *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae).

Por último, se realizó una pasantía de investigación de corta estancia en el Laboratorio de Entomología Médica y Veterinaria, del Departamento de Zoología (Universidad Federal de Paraná - Brasil). En dicha pasantía se fortaleció el desarrollo de técnicas de laboratorio en: Mutaciones *kdr* asociadas con resistencia en *Stegomyia aegypti* y cuantificación de actividad de enzimas en *Stegomyia aegypti*.